



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0024909

(51)⁷ A23K 1/18; A23K 1/00; A23K 1/175

(13) B

(21) 1-2012-00460

(22) 23/07/2010

(86) PCT/NL2010/050473 23/07/2010

(87) WO2011/010921 27/01/2011

(30) 09166276.7 23/07/2009 EP

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/04/2013 301A

(73) PROVIMI HOLDING B.V. (NL)

Veerlaan 17-23, NL-3072 AN Rotterdam, Netherlands

(72) PERDOK, Hindrik Bene (NL); VAN ZIJDERVELD, Sander Martjin (NL);

NEWBOLD, John Richard (GB); HULSHOF, Rob Bernard Anton (NL);

DESWYSEN, David (NL); GERRITS, Walter Jan Jozef (NL); DIJKSTRA, Jan (NL);

LENG, Ronald Alfred (AU).

(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP KHÔNG PHẢI PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐỀ LÀM
GIẢM SỰ SINH METAN TRONG DẠ DÀY - RUỘT Ở ĐỘNG VẬT NHAI LẠI
VÀ CHẾ PHẨM BỔ SUNG THỨC ĂN DÀNH CHO ĐỘNG VẬT NHAI LẠI

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại với sự hỗ trợ của chất cạnh tranh với nguyên tử hydro cần cho sự sinh metan trong quá trình lên men bình thường thức ăn đã tiêu hóa. Sáng chế cũng đề cập đến việc phát hiện ra con đường khử nitrat cũng như khử sulphat cạnh tranh với con đường tổng hợp khí metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại và, mà hiệu quả làm giảm sự sinh metan của nitrat và sulphat là chất phụ gia hoàn chỉnh. Đồng thời, việc dùng kết hợp nitrat và sulphat được phát hiện là hoàn toàn hữu hiệu trong việc tránh hoặc giảm các vấn đề ngộ độc nitrit tiềm tàng thường gặp phải khi sử dụng một mình nitrat, mà mà hiệu quả này còn được cải thiện, khi cần, bằng cách bổ sung vi sinh vật có lợi khử nitrit. Do đó, sáng chế đề cập đến sản phẩm chứa hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat với lượng cao và tùy ý còn chứa vi sinh vật có lợi khử nitrit, cũng như phương pháp làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại bằng cách cho động vật sử dụng chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực chất phụ gia thức ăn và thức ăn bổ sung dùng cho động vật nhai lại. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột của động vật nhai lại với sự hỗ trợ của chất ức chế mà cạnh tranh nguyên tử hydro cần thiết cho các vi sinh vật sinh khí metan trong quá trình lên men bình thường của thức ăn đã tiêu hóa. Sáng chế còn đề cập đến thức ăn bổ sung và chế phẩm thức ăn chứa chất ức chế này, thức ăn bổ sung và chế phẩm thức ăn này được dùng không nhằm mục đích trị liệu để làm giảm sự sinh metan.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự sinh metan là con đường chính để loại bỏ hydro (H_2) trong quá trình lên men ở dạ cỏ (Beauchemin et al., 2008). Việc loại bỏ H_2 khỏi môi trường dạ cỏ là cần thiết để tiếp tục quá trình lên men trong dạ cỏ một cách hiệu quả, nhưng metan sinh ra từ quá trình sinh metan được coi là gây thất thoát năng lượng trong khẩu phần ăn của động vật (Johnson và Johnson, 1995) đồng thời tạo ra khí nhà kính góp phần đáng kể làm trái đất ấm lên (Steinfeld et al., 2006). Hai hậu quả này dẫn đến việc nỗ lực tìm kiếm trên phạm vi toàn cầu về chất phụ gia thức ăn để làm giảm sự sinh metan ở động vật nhai lại.

Một trong số các phương án đã được phát hiện là có tác dụng làm giảm sự sinh metan là chuyển hướng H_2 dư thừa vào các quá trình tạo ra các sản phẩm có lợi hơn cho động vật nhai lại, nhờ đó làm giảm sự sinh metan. Ví dụ bao gồm việc kích thích sản sinh propionat bằng cách thêm các tiền chất propionat và các nỗ lực đưa quá trình tạo ra axetat khử vào dạ cỏ (Joblin, 1999, Molano et al., 2008). Việc đưa các quá trình này vào trong dạ cỏ sẽ lần lượt tạo ra propionat hoặc axetat làm chất dinh dưỡng cho động vật, đồng thời giảm tính khả dụng của H_2 trong việc sinh metan. Tuy nhiên, việc đưa các tiền chất propionat (malat và fumarat) gây ra các ảnh hưởng khác nhau lên sự sinh metan (Asanuma et al., 1999, Ungerfeld et al., 2007) và các cố gắng đưa quá trình tạo axetat khử vào dạ cỏ đã thất bại do ái lực với hydro thấp hơn so với sự sinh metan (Le Van et al., 1998).

Các phương án khác để làm giảm sự sinh metan đã được mô tả trong US 5,843,498, đề cập đến chế phẩm thức ăn cho động vật nhai lại để làm giảm sự sinh metan trong dạ cỏ và cải thiện hiệu quả của thức ăn, chế phẩm này chứa xystein và/hoặc muối của nó làm thành phần hữu hiệu.

Một số nhóm nghiên cứu đã xem xét kỹ khả năng của nitrat trong việc dùng làm chất phụ gia thức ăn để làm giảm metan, và việc bổ sung nitrat có vẻ có tác dụng làm giảm một cách thích hợp sự sinh metan (Guo et al., 2009, Sar et al., 2005, Takahashi et al., 1998).

Khả năng đưa nitrat (NO_3) vào thức ăn làm nguồn hydro thay thế nhằm làm giảm sự sinh metan trong dạ cỏ trước đây không được quan tâm, do đã phát hiện thấy tác dụng gây độc của nitrit được tạo ra dưới dạng hợp chất trung gian trong quá trình khử nitrat thành amoniac trong dạ cỏ (Lewis, 1951). Nitrat có mặt ở nồng độ cao trong khẩu phần ăn của động vật nhai lại được cho là nguyên nhân gây ra chứng methemoglobin huyết, làm giảm khả năng vận chuyển oxy của máu đến các mô của động vật này. Ngoài ra, sự tích tụ nitrit trong dạ cỏ đã biết là làm giảm hoạt tính của vi sinh vật trong dạ cỏ, mà không kể những cái khác có thể làm giảm sự hấp thụ thức ăn của động vật.

Đã có đề xuất về việc bổ sung format, lactat hoặc fumarat cho động vật nhai lại đã hấp thụ lượng lớn nitrat để làm giảm tác dụng ức chế của nitrit lên quá trình lên men (Iwamoto, 1999; Iwamoto, 2001). Việc sử dụng đồng thời nitrat và GOS hoặc nisin cũng được thông báo là biện pháp hữu hiệu để làm giảm nồng độ nitrit trong dạ cỏ và huyết tương và giảm methemoglobin, đồng thời duy trì sự sinh metan trong dạ cỏ ở mức thấp so với trường hợp chỉ bổ sung mình nitrat (Sar, 2004).

Việc thúc đẩy quá trình khử nitrit bằng cách sử dụng vi sinh vật có lợi cũng là đối tượng được nghiên cứu rộng rãi. Patent Mỹ số 6,120,810 mô tả phương pháp giảm sự ngộ độc nitrat ở động vật nhai bằng cách cho động vật dùng chế phẩm chứa vi sinh vật khử nitrit *Propionibacterium acidipropionici* với lượng hữu hiệu. Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 1 630 226 mô tả chế phẩm thức ăn dùng cho động vật nhai lại chứa vi khuẩn có hoạt tính nitrit reductaza, được chọn từ vi khuẩn đường ruột, vi khuẩn coryneform, *Bacillus subtilis*, vi khuẩn thuộc chi *Metylophilus*, *Actinomyces*, vi

khuẩn trong dạ cỏ và hỗn hợp của chúng. Cũng đã được báo cáo rằng (Sar, 2005) E. Coli W3110 có thể được dùng để giảm ngộ độc trong trường hợp sử dụng nitrat nhằm ức chế sự sinh metan ở động vật nhai lại.

Tác dụng ức chế của các hợp chất lưu huỳnh, đồng và vonfram trong việc khử nitrat đã được nghiên cứu (Takahashi, 1989). Các tác giả này đã báo cáo rằng trong dịch dạ cỏ thu được từ các con cừu thiếu đã thích nghi với nitrat (được dùng 0,55g NaNO₃/kg cân nặng hai lần một ngày), sự tạo thành nitrit không bị ảnh hưởng bởi việc lên men với lưu huỳnh sulphat cũng như lên men với lưu huỳnh sulphit. Trong số các axit amin chứa lưu huỳnh, metionin đã được chứng tỏ là không có hiệu quả trong việc ức chế sự khử nitrat bởi vì khuẩn trong đó xystein lại làm giảm đáng kể sự tạo thành nitrit. Công bố này không tập trung hoặc đề cập đến tác dụng làm giảm sự sinh metan bất kỳ. Hiệu quả của xystein trong việc ngăn ngừa sự tích tụ nitrit đã được khẳng định trong các nghiên cứu sau đó (Takahashi, 1991; Takahashi 1998).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

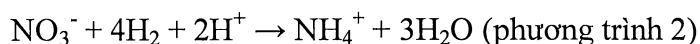
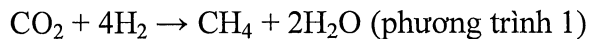
Do đó, mục đích chính của sáng chế là đề xuất phương pháp, và chế phẩm được dùng trong phương pháp này, để giảm hơn nữa sự sinh metan ở động vật nhai lại đồng thời tránh được hoặc khắc phục được các vấn đề cụ thể liên quan đến sự tích tụ nitrit.

Theo một khía cạnh, sáng chế tập trung vào việc phát hiện ra rằng con đường khử nitrat cũng như con đường khử sulphat vượt trội hơn con đường sinh metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại và rằng tác dụng làm giảm sự sinh metan của nitrat và sulphat đạt được khi được dùng riêng lẻ là hoàn toàn có tính cộng hợp, như được minh họa chi tiết trong phần thử nghiệm. Tác dụng riêng của nitrat và sulphat dường như là độc lập với nhau.

Đồng thời, việc sử dụng kết hợp nitrat và sulphat đã được thấy là có hiệu quả đầy đủ trong việc tránh hoặc giảm được các vấn đề ngộ độc nitrit tiềm ẩn thường gặp phải khi sử dụng một mình nitrat, như được minh họa chi tiết hơn trong phần thử nghiệm.

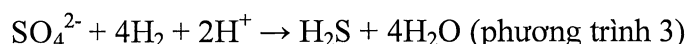
Bất ngờ là trong khi việc sử dụng nitrat được thấy là làm giảm lượng sinh vật sinh khí metan trong ruột, thì việc sử dụng sulphat hoặc hỗn hợp của nitrat và sulphat lại không có tác dụng này. Tuy nhiên, việc sử dụng hỗn hợp của nitrat và sulphat làm giảm đáng kể tỷ lệ sinh vật sinh khí metan trong tổng số vi khuẩn.

Mặc dù phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở hoặc thu hẹp bởi lý thuyết hoặc giả thuyết bất kỳ, tin rằng việc sử dụng H_2 thay thế trong quá trình khử nitrat thành amoniac làm sự giảm sinh metan (phương trình 1) bởi nitrat. Quá trình khử nitrat trong dạ cỏ được tin là tuân theo con đường khử được mô tả theo phương trình 2. Điều này có nghĩa là 8mol H được dùng để khử nitrat, nhờ đó về mặt lý thuyết làm giảm sự sinh metan 1 mol với mỗi mol nitrat được ăn. Do đó, mỗi 100g NO_3 được ăn sẽ làm giảm 25,8g CH_4 .



Việc khử nitrat thành amoniac sẽ tạo ra nhiều năng lượng hơn so với việc khử CO_2 thành CH_4 , vì thế có thể mong đợi rằng đây sẽ là con đường loại bỏ H_2 chính nếu có đủ nitrat trong dạ cỏ. Việc khử hoàn toàn NO_3 thành NH_3 cần tiêu thụ 8 electron và do đó mỗi mol nitrat được khử có thể làm giảm việc giải phóng 1 mol metan. Sản phẩm cuối của phản ứng, amoniac, có thể được coi là chất dinh dưỡng có giá trị đối với động vật nhai lại ăn khẩu phần ăn nghèo protein.

Như nêu trên, tác giả sáng chế đã thấy rằng chính sulphat cũng là chất khử mạnh có tác dụng làm giảm sự giải phóng metan bằng cơ chế độc lập với việc khử nitrat. Việc khử sulphat thành H_2S (phương trình 3) cũng tiêu thụ 8 electron và vì thế cũng có khả năng làm giảm sự giải phóng metan bằng như nitrat cho mỗi mol tương tự.



Việc phát hiện ra rằng sulphat cũng có tác dụng làm giảm sự sinh metan có thể được giải thích từ thực tế là, theo khía cạnh nhiệt động học, sự khử sulphat cũng có thể được ưu tiên hơn sự sinh metan. Về mặt hệ số tỷ lệ, việc khử hoàn toàn 100g sulphat thành hydro sulphua sẽ làm giảm 16,7g CH_4 sinh ra.

Hydro sulphua (H_2S) có vẻ đóng vai trò làm chất cho electron để khử NO_2 thành NH_4^+ , và do đó việc bổ sung sulphat vào khẩu phần ăn có thể còn làm giảm sự tích tụ nitrit trong dạ cỏ.

Hơn nữa đã thấy rằng kết quả có thể được tăng cường bằng cách sử dụng thêm lượng hữu hiệu vi sinh vật có lợi khử nitrit. Như được minh họa chi tiết trong phần thử

nghiệm, việc trì hoãn ban đầu được quan sát thấy trong quá trình khởi phát việc khử nitrit bởi sulphat, mà có thể được giải thích bằng sự trì hoãn tính khả dụng của H_2S ngay sau khi dung nạp thức ăn. Điều này có thể làm giảm sự hấp thụ thức ăn, và do đó một mục đích khác của sáng chế là để tránh được hiện tượng này. Tác giả sáng chế đã thấy rằng điều này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời vi sinh vật có lợi khử nitrit như được minh họa chi tiết trong phần thử nghiệm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện sản lượng metan (l/giờ) trong khoảng thời gian 24 giờ ở các con cừu con lai Texel được nhận khẩu phần ăn cơ bản hoặc một trong số ba khẩu phần ăn thử nghiệm, được bổ sung hợp chất nitrat, hợp chất sulphat hoặc hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat.

Fig.2 là đồ thị thể hiện mức tiêu thụ oxy (l/kg MW/giờ) trong khoảng thời gian 24 giờ ở các con cừu non lai Texel được nhận khẩu phần ăn cơ bản hoặc một trong số ba khẩu phần ăn thử nghiệm, được bổ sung hợp chất nitrat, hợp chất sulphat hoặc hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat.

Fig.3 là đồ thị thể hiện nồng độ methaemoglobin trong máu của các con bò nhận một trong số bốn khẩu phần ăn thử nghiệm, được bổ sung nitrat, hoặc một trong số ba hỗn hợp của nitrat và các lượng sulphat tăng dần.

Fig.4 là hình thể hiện sự sinh khí trong quy trình mô phỏng dạ cỏ với các sản phẩm thử nghiệm khác nhau. Các hình từ A đến C thể hiện sự sinh khí tích lũy tại các thời điểm xác định. Thanh sai số cho biết SE giữa các bình mô phỏng sao chép và dấu hoa thị biểu thị sự sai khác về mặt thống kê với mẫu đối chứng chứa $Ca(NO_3)_2 + MgSO_4$ (được đề cập đến là “không”) bằng kiểm định t.

Fig.5 là hình thể hiện sự sinh metan trong quy trình mô phỏng dạ cỏ với các sản phẩm thử nghiệm khác nhau. Hình A thể hiện sự tích tụ khí metan sau quy trình mô phỏng 12 giờ, và, hình B thể hiện tỷ lệ khí metan trong tổng số khí sinh ra. Thanh sai số cho biết SE giữa các bình mô phỏng sao chép và dấu hoa thị thể hiện sự sai khác về mặt thống kê với mẫu đối chứng chứa $Ca(NO_3)_2 + MgSO_4$ (được đề cập đến là “không”) bằng kiểm định t.

Fig.6 là hình thể hiện nồng độ nitrat còn lại trong quy trình mô phỏng dạ cỏ với các sản phẩm thử nghiệm khác nhau. Các hình từ A đến C lần lượt thể hiện nồng độ nitrat còn lại sau 2, 4 và 12 giờ lên men. Thanh sai số cho biết SE giữa các bình mô phỏng sao chép và dấu hoa thị thể hiện sự sai khác về mặt thống kê với mẫu đối chứng chứa $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{MgSO}_4$ (được đề cập đến là “không”) bằng kiểm định t.

Fig.7 là đồ thị thể hiện nồng độ nitrit còn lại trong quy trình mô phỏng dạ cỏ với các sản phẩm thử nghiệm khác nhau. Các hình từ A đến C lần lượt thể hiện nồng độ nitrit còn lại sau 2, 4 và 12 giờ lên men. Thanh sai số cho biết SE giữa các bình mô phỏng sao chép và dấu hoa thị thể hiện sự sai khác về mặt thống kê với mẫu đối chứng chứa $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{MgSO}_4$ (được đề cập đến là “không”) bằng kiểm định t.

Fig.8 là hình thể hiện nồng độ amoni còn lại trong quy trình mô phỏng dạ cỏ với các sản phẩm thử nghiệm khác nhau. Các hình từ A đến C lần lượt thể hiện nồng độ amoni còn lại sau 2, 4 và 12 giờ lên men. Thanh sai số cho biết SE giữa các bình mô phỏng sao chép và dấu hoa thị thể hiện sự sai khác về mặt thống kê với mẫu đối chứng chứa $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{MgSO}_4$ (được đề cập đến là “không”) bằng kiểm định t.

Mô tả chi tiết sáng chế

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề cập đến thức ăn bổ sung trong chăn nuôi chứa hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 100%.

Trong phần mô tả và phần yêu cầu bảo hộ, động từ “chứa” và các kết hợp của nó được dùng với ý nghĩa không giới hạn để xác định rằng các đối tượng đứng sau từ này được bao gồm, nhưng cũng không loại trừ các đối tượng không được đề cập đến một cách cụ thể. Ngoài ra, việc viện dẫn đến một yếu tố bằng mạo từ không xác định “một” không loại trừ khả năng có nhiều hơn một yếu tố, trừ khi có chỉ định cụ thể khác mà nó có nghĩa là một và chỉ một trong số các nguyên tố này. Mạo từ không xác định “một” thường có nghĩa là “ít nhất một”.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thức ăn bổ sung trong chăn nuôi” chỉ hỗn hợp sơ chế chất phụ gia cô đặc chứa các thành phần hoạt tính, hỗn hợp sơ chế hoặc chế phẩm bổ sung này có thể được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi hoặc khẩu phần để tạo thành thức ăn được bổ sung theo sáng chế. Thuật ngữ “hỗn hợp sơ

chế thức ăn chăn nuôi”, “thức ăn bổ sung trong chăn nuôi”, và “chất phụ gia thức ăn chăn nuôi” thường được coi là có nghĩa tương tự hoặc giống nhau và thường có thể được dùng thay thế cho nhau. Thông thường, thức ăn bổ sung trong chăn nuôi theo sáng chế có dạng bột, dạng rắn được nén hoặc được tạo hạt. Thực tế, vật nuôi thường có thể được cho ăn thức ăn bổ sung trong chăn nuôi bằng cách bổ sung nó trực tiếp vào khẩu phần, ví dụ dưới dạng lớp phủ trên bề mặt, hoặc nó có thể được dùng trong quy trình điều chế hoặc sản xuất sản phẩm như thức ăn dùng trong chăn nuôi dạng hỗn hợp hoặc tảng khoáng liếm, sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Sáng chế không bị giới hạn cụ thể trong khía cạnh này. Chế phẩm bổ sung theo sáng chế thường được cho động vật ăn với lượng nằm trong khoảng từ 16 đến 2500g/động vật/ngày.

Thức ăn bổ sung trong chăn nuôi theo sáng chế chứa hợp chất nitrat, thường là hợp chất nitrat chấp nhận được về mặt sinh lý hoặc dung nạp được. Theo sáng chế, nitơ nitrat cần phải có sẵn cho bước khử bởi vi sinh vật trong dạ cỏ hoặc ruột và hợp chất nitrat này cần có độ tan thích hợp trong nước. Do đó, theo sáng chế, tốt hơn là hợp chất nitrat là hợp chất nitrat dạng ion, tốt nhất là muối nitrat vô cơ, như natri nitrat, kali nitrat, canxi nitrat, amoni nitrat, tất cả chúng đều dễ tan trong nước ở nhiệt độ và áp suất chuẩn. Ngoài ra, từ khía cạnh sức khỏe và độ an toàn, thường ưu tiên sử dụng muối phức nitrat vô cơ, như hợp chất có công thức $5 \cdot \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, được Yara bán trên thị trường dưới tên thương mại ‘Calcinit’.

Thức ăn bổ sung trong chăn nuôi theo sáng chế còn chứa hợp chất sulphat, thường là hợp chất sulphat chấp nhận được về mặt sinh lý hoặc dung nạp được. Theo sáng chế, ưu tiên hợp chất sulphat là hợp chất sulphat dạng ion, tốt nhất là hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm muối sulphat vô cơ, phần lớn trong số đó tan nhiều trong nước. Trường hợp ngoại lệ bao gồm canxi sulphat. Được đặc biệt ưu tiên là hợp chất sulphat được chọn từ nhóm bao gồm muối sulphat vô cơ tan được, bao gồm natri sulphat, kali sulphat, magie sulphat, kẽm sulphat, mangan sulphat, đồng sulphat và sắt II sulphat.

Theo các phương án được ưu tiên của sáng chế, chế phẩm bổ sung chứa hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 100% trọng lượng, tốt hơn là lượng này lớn hơn 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% trọng lượng, tính theo trọng lượng khô.

Do một phần sáng chế tập trung vào việc phát hiện ra rằng vì mục đích làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại, nitrat và sulphat có thể thay thế cho nhau một phần, tỷ lệ mol giữa nitrat và sulphat trong chế phẩm bổ sung thường có thể nằm trong khoảng từ 100:1 đến 1:50, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50:1 đến 1:10, 25:1 đến 1:5, hoặc nằm trong khoảng từ 10:1 đến 1:2,5 và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 5:1 đến 1:1.

Hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat trong chế phẩm bổ sung thức ăn theo sáng chế thường cung cấp tổng lượng nitrat và sulphat nhiều hơn 50g/kg, tính theo trọng lượng khô. Theo một phương án ưu tiên, tổng lượng nitrat và sulphat nhiều hơn 75g/kg, tốt hơn nữa là 90g/kg, tốt nhất là 100g/kg. Trên thực tế, lượng này thường ít hơn 750g/kg. Theo một phương án được ưu tiên khác, lượng sulphat trong chế phẩm bổ sung thức ăn nhiều hơn 25g/kg, tốt hơn nữa là 40g/kg, tốt nhất là 50g/kg, tính theo trọng lượng khô. Thông thường, lượng này không nhiều hơn 250g/kg, tốt hơn là không nhiều hơn 200g/kg, tốt nhất là không nhiều hơn 165g/kg. Theo một phương án được ưu tiên khác, lượng nitrat trong chế phẩm bổ sung thức ăn nhiều hơn 20g/kg, tốt hơn nữa là 30g/kg, tốt nhất là 40g/kg, tính theo trọng lượng khô. Thông thường lượng này ít hơn 600g/kg, tốt hơn nữa là ít hơn 550g/kg, tính theo trọng lượng khô.

Tất cả các lượng và/hoặc liều lượng của 'nitrat' và/hoặc 'sulphat' được sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi được quy định theo cách khác, chỉ trọng lượng của nitrat và/hoặc sulphat được bao gồm trong hoặc được cung cấp bởi các hợp chất nitrat và/hoặc sulphat, so với tổng trọng lượng khô của thành phần này, như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định chính xác lượng lý tưởng của các thành phần được đưa vào chế phẩm bổ sung và lượng chế phẩm bổ sung được dùng để điều chế khẩu phần ăn hoặc thức ăn chăn nuôi hỗn hợp, v.v., xét theo loại động vật cụ thể và môi trường nuôi nhốt chúng. Liều lượng ưu tiên của mỗi thành phần được đưa ra dưới đây.

Thức ăn bổ sung trong chăn nuôi theo sáng chế có thể chứa thành phần khác bất kỳ mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Nó có thể thường chứa các tá dược đã biết cần để điều chế dạng sản phẩm mong muốn và nó có thể còn chứa các chất phụ gia nhằm mục đích cải thiện chất lượng của thức ăn và/hoặc cải thiện hiệu suất của

động vật tiêu thụ chế phẩm bổ sung này. Ví dụ thích hợp về tá dược này bao gồm chất mang hoặc chất độn, như lactoza, sucroza, manitol, tinh bột xenluloza tinh thể, natri hydro cacbonat, natri clorua và dạng tương tự và chất gắn kết, như gôm arabic, gôm tragacan, natri alginat, tinh bột, PVP và dẫn xuất xenluloza, v.v.. Ví dụ về chất phụ gia thức ăn đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm các vitamin, axit amin và các nguyên tố vi lượng, các chất tăng cường khả năng tiêu hóa và chất làm ổn định hệ vi sinh vật đường ruột và dạng tương tự.

Theo một phương án ưu tiên, thức ăn bổ sung trong chăn nuôi còn chứa vi sinh vật có lợi (probiotic) khử nitrit. Trong bản mô tả này, thuật ngữ 'vi sinh vật có lợi khử nitrit' được dùng để chỉ vi sinh vật sống mà khi được dùng với lượng thích hợp sẽ tạo ra các lợi ích về sức khỏe cho vật chủ, bằng cách khử nitrit tích lũy trong dạ cỏ và/hoặc ruột thành amoni như được giải thích trên đây. Một số ví dụ về vi sinh vật khử nitrit này là đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ ưu tiên về vi sinh vật có lợi khử nitrit bao gồm vi khuẩn trong dạ cỏ và trong ruột có hoạt tính nitrit reductaza, *Propionibacterium acidipropionici*, vi khuẩn coryneform, *Bacillus subtilis*, vi khuẩn thuộc chi *Metylophilus*, *Actinomyces* và *Escherichia coli* W3110. Theo sáng chế, tốt nhất là, vi sinh vật có lợi khử nitrit được chọn từ nhóm bao gồm *Megasphaera elsdenii*, cụ thể là chủng vi khuẩn trong dạ cỏ của chúng, và *Propionibacterium acidipropionici*, cụ thể là *Propionibacteria acidipropionici* chủng P5, được đăng ký với số nộp lưu 55467 trong bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ (ATCC) và được bán trên thị trường là 'chất cô Bova-Pro[®]' từ Agtech Products Inc.

Theo một phương án ưu tiên, thức ăn bổ sung trong chăn nuôi như được xác định trên đây được đề xuất, thức ăn này còn chứa vi sinh vật có lợi khử nitrit với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ đến $1,0 \times 10^{14}$ cfu/kg, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{13}$ cfu/kg, tốt nhất là nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^{10}$ đến $1,0 \times 10^{12}$ cfu/kg, ví dụ $1,0 \times 10^{11}$ cfu/kg, tính theo trọng lượng khô. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU) là đơn vị đo của số lượng vi khuẩn hoặc nấm còn sống. Không giống như việc đếm trực tiếp trên kính hiển vi trong đó tất cả tế bào, chết và sống, đều được đếm, thì CFU tính các tế bào sống và ví dụ được xác định bằng cách trải mẫu (đã pha loãng) lên đĩa thạch hoặc thạch trypticaza đậu tương và đếm các khuẩn lạc thu được từ đó.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã thấy rằng khi sử dụng axit lactic hoặc hợp chất lactat cũng thu được kết quả tốt. Không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, tin rằng việc bổ sung axit lactic hoặc lactat có thể tăng cường hiệu quả của vi sinh vật có lợi. Do đó, theo một phương án ưu tiên, thức ăn chăn nuôi hỗn hợp như được xác định ở trên được đề xuất, thức ăn này còn chứa lượng hữu hiệu của lactat hoặc axit lactic, tốt hơn là nó chứa axit lactic hoặc lactat với lượng nhiều hơn 20g/kg, tốt hơn nữa là nhiều hơn 30g/kg, tốt nhất là nhiều hơn 40g/kg, tính theo trọng lượng khô.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến sản phẩm như thức ăn chăn nuôi hỗn hợp và tăng khoáng liếm, chứa chế phẩm bổ sung như được xác định ở trên.

Do đó, theo một khía cạnh, chế phẩm thức ăn chăn nuôi dạng hỗn hợp được đề xuất chứa hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat, hỗn hợp này cung cấp tổng lượng nitrat và sulphat nhiều hơn 10g/kg, tính theo trọng lượng khô.

Thuật ngữ “chế phẩm thức ăn chăn nuôi dạng hỗn hợp” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là chế phẩm thích hợp để dùng làm thức ăn chăn nuôi và được phối trộn từ các loại nguyên liệu thô hoặc cơ bản có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên và/hoặc các chất phụ gia khác nhau. Do đó, cụ thể, thuật ngữ ‘dạng hỗn hợp’ được dùng ở đây để phân biệt chế phẩm thức ăn chăn nuôi theo sáng chế với nguyên liệu thô có trong tự nhiên bất kỳ. Các hỗn hợp hoặc thức ăn dạng hỗn hợp này được tạo chế phẩm theo nhu cầu cụ thể của động vật mục tiêu. Các thành phần chính được dùng trong thức ăn dạng hỗn hợp có bán trên thị trường bao gồm cám lúa mì, cám lúa gạo, bột ngô, bột ngũ cốc, như lúa mạch, lúa mì, lúa mạch đen và yến mạch, bột đậu tương, bột cỏ linh lăng, bột lúa mì và dạng tương tự. Thức ăn dạng hỗn hợp có bán trên thị trường thường chứa protein thô với lượng không nhỏ hơn 15% và tổng chất dinh dưỡng có thể tiêu hóa được có với lượng không nhỏ hơn 70%, mặc dù sáng chế không bị giới hạn cụ thể trong phạm vi này. Chế phẩm thức ăn chăn nuôi dạng hỗn hợp dạng lỏng, rắn cũng như bán rắn được bao gồm trong phạm vi của sáng chế, nhưng dạng rắn và bán rắn được ưu tiên đặc biệt. Các chế phẩm này thường được sản xuất dưới dạng bột, viên tròn hoặc mảnh vụn. Trên thực tế, vật nuôi có thể thường được cho ăn hỗn hợp của thức ăn dạng hỗn hợp, như chế phẩm theo sáng chế, và cỏ ủ tươi hoặc cỏ khô hoặc dạng tương tự. Thông thường, thức ăn dùng trong chăn nuôi

dạng hỗn hợp được cho ăn với lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 10kg/động vật/ngày. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định được lượng thích hợp của các thành phần được bao gồm trong thức ăn dùng trong chăn nuôi dạng hỗn hợp, tùy thuộc vào loại động vật và điều kiện nuôi nhốt cụ thể.

Hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat trong thức ăn dùng trong chăn nuôi dạng hỗn hợp theo sáng chế thường cung cấp tổng lượng nitrat và sulphat nhiều hơn 10g/kg, tính theo trọng lượng khô. Theo một phương án ưu tiên, tổng lượng nitrat và sulphat nhiều hơn 15g/kg, tốt hơn nữa là nhiều hơn 17,5g/kg, tốt nhất là nhiều hơn 20g/kg. Trên thực tế, lượng này thường ít hơn 750g/kg, tốt hơn là ít hơn 500g/kg, tốt hơn nữa là ít hơn 250g/kg. Theo một phương án được ưu tiên khác, lượng sulphat trong thức ăn dùng trong chăn nuôi dạng hỗn hợp nhiều hơn 5g/kg, tốt hơn nữa là nhiều hơn 7,5g/kg, 10g/kg, hoặc 12g/kg, tính theo trọng lượng khô. Thông thường, lượng này không nhiều hơn 200g/kg, tốt hơn là không nhiều hơn 175g/kg, tốt nhất là không nhiều hơn 150g/kg. Theo một phương án được ưu tiên khác, lượng nitrat trong thức ăn dùng trong chăn nuôi dạng hỗn hợp nhiều hơn 5g/kg, tốt hơn nữa là nhiều hơn 7,5g/kg, tốt nhất là nhiều hơn 10g/kg, tính theo trọng lượng khô. Thông thường, lượng này ít hơn 600g/kg, tốt hơn nữa là ít hơn 500g/kg, tốt nhất là ít hơn 250g/kg, tính theo trọng lượng khô. Ngoài ra, theo một phương án ưu tiên, thức ăn dùng trong chăn nuôi dạng hỗn hợp như được xác định ở trên còn bao gồm vi sinh vật có lợi khử nitrit với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ đến $1,0 \times 10^{14}$ cfu/kg, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{13}$ cfu/kg, tốt nhất là nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^{10}$ đến $1,0 \times 10^{12}$ cfu/kg. Ngoài ra, theo một phương án ưu tiên, thức ăn dùng trong chăn nuôi dạng hỗn hợp như được xác định ở trên còn gồm lượng hữu hiệu của lactat hoặc axit lactic, tốt hơn là với lượng nhiều hơn 5g/kg, tốt hơn nữa là nhiều hơn 7,5g/kg, tốt nhất là nhiều hơn 10g/kg.

Chế phẩm thức ăn chăn nuôi dạng hỗn hợp theo sáng chế còn có thể chứa chất phụ gia thức ăn thường được dùng trong lĩnh vực. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật biết rằng thuật ngữ ‘chất phụ gia thức ăn’ trong bản mô tả này được dùng để chỉ sản phẩm được dùng trong dinh dưỡng động vật nhằm mục đích cải thiện chất lượng thức ăn và chất lượng thực phẩm có nguồn gốc từ động vật, hoặc cải thiện năng suất của động vật, ví dụ cải thiện khả năng tiêu hóa nguyên liệu thức ăn. Ví dụ

không giới hạn bao gồm các chất phụ gia như chất bảo quản, chất chống oxy hóa, chất nhũ hóa, chất ổn định, chất điều chỉnh độ axit và các chất phụ gia thức ăn sẵn cho gia súc; các chất phụ gia cải thiện tính chất cảm quan, đặc biệt là hương liệu và chất tạo màu; các chất phụ gia dinh dưỡng (khác nữa), như vitamin, axit amin và các nguyên tố vi lượng; và các chất phụ gia chăn nuôi (khác nữa), như các chất tăng cường khả năng tiêu hóa và chất làm ổn định hệ vi sinh vật ruột.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng chế phẩm thức ăn chăn nuôi dạng hỗn hợp có thể còn chứa các thành phần hoặc chất phụ gia khác nữa, mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tảng đá liếm hoặc tảng khoáng liếm chứa chế phẩm bổ sung theo sáng chế. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng đá liếm hoặc tảng khoáng liếm này đặc biệt thuận lợi để cung cấp chất khoáng bổ sung (cũng như các protein và hydratcacbon) vào thức ăn cho động vật nhai lại được chăn thả cả ngoài tự nhiên lẫn nuôi nhốt. Tảng khoáng liếm hoặc đá liếm theo sáng chế thường bao gồm, ngoài hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat và vi sinh vật có lợi khử nitrit tùy ý theo sáng chế, các loại chất kết dính khác, ví dụ xi măng, thạch cao, đá vôi, canxi phosphat, cacbonat, và/hoặc gelatin; và tùy ý các chất phụ gia khác như các vitamin, các nguyên tố vi lượng, muối khoáng, các chất phụ gia cải thiện tính chất cảm quan, v.v..

Hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat trong tảng khoáng liếm theo sáng chế thường cung cấp tổng lượng nitrat và sulphat nhiều hơn 15g/kg, tính theo trọng lượng khô. Theo một phương án ưu tiên, tổng lượng nitrat và sulphat nhiều hơn 25g/kg, tốt hơn nữa là nhiều hơn 30g/kg. Thực tế, lượng này thường ít hơn 450g/kg, tốt hơn là ít hơn 400g/kg. Theo một phương án được ưu tiên khác, lượng sulphat trong tảng khoáng liếm nhiều hơn 3g/kg, tốt hơn nữa là nhiều hơn 5g/kg, tốt nhất là nhiều hơn 6g/kg, tính theo trọng lượng khô. Thông thường, lượng này không nhiều hơn 150g/kg, tốt hơn là không nhiều hơn 100g/kg, tốt nhất là không nhiều hơn 75g/kg. Theo một phương án được ưu tiên khác, lượng nitrat trong tảng khoáng liếm nhiều hơn 10g/kg, tốt hơn nữa là nhiều hơn 20g/kg, tốt nhất là nhiều hơn 25g/kg, tính theo trọng lượng khô. Thông thường, lượng này ít hơn 400g/kg, tốt hơn nữa là ít hơn 300g/kg, tính theo trọng lượng khô. Theo một phương án ưu tiên, tảng khoáng liếm như được

xác định ở trên được đề xuất, chứa vi sinh vật có lợi khử nitrit với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^8$ đến $1,0 \times 10^{14}$ cfu/kg, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{13}$ cfu/kg, tốt nhất là nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^{10}$ đến $1,0 \times 10^{12}$ cfu/kg.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại, phương pháp này bao gồm bước cho động vật nhai lại dùng lượng hiệu quả của hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat trong đó phương pháp này không phải là phương pháp điều trị bệnh.

Thuật ngữ ‘làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột’ trong bản mô tả này được dùng để chỉ việc giảm sự tạo ra khí metan trong dạ dày-ruột. Như đã giải thích ở trên, quá trình lên men trong dạ cỏ và ruột non của động vật nhai lại làm tăng lượng khí metan sinh ra bởi cái được gọi là vi khuẩn sinh metan. Sáng chế cũng nhằm mục đích làm giảm quá trình này, như làm giảm việc bài tiết trực tiếp metan từ dạ dày-ruột. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể đánh giá được lượng metan bài tiết ra từ động vật. Như đã được giải thích ở trên, sự sinh metan trong dạ cỏ và ruột là quá trình thường xảy ở động vật khỏe mạnh và sự sinh metan giảm không làm tăng hoặc giảm tình trạng sức khỏe chung hoặc sự sống của động vật nhai lại. Tuy nhiên, việc giảm sự tạo thành metan bằng cách sử dụng hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat có thể tăng hiệu quả sử dụng chất dinh dưỡng ở động vật, khiến cho phương pháp này có thể tăng cường sự tăng trưởng và/hoặc năng suất của động vật.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng biết được phương pháp điều trị theo sáng chế sẽ không có tác dụng trong việc điều trị tình trạng bệnh đã biết như ‘chướng hơi’. Chướng hơi là tình trạng thường được mô tả là sự căng phồng bất thường của dạ cỏ do sự tích tụ khí trong dạ cỏ. Khí (cacbon đioxit, metan và các khí khác) thường được sinh ra trong quá trình lên men ở dạ cỏ và thường được ợ ra qua thực quản, để ngăn ngừa sự tích tụ khí. Khi bị chướng hơi, thực quản bị chặn bởi lớp bọt. Phần hở của thực quản chứa các thụ thể chặn thực quản nếu chất lỏng (hoặc bọt) được cảm nhận. Bọt được tạo thành khi chướng hơi là kết quả của việc lên men nhanh các hạt thức ăn nhỏ. Nguyên nhân của tình trạng chướng hơi là sự tạo thành bọt mà không phải là sự sản sinh các chất khí trong dạ cỏ, là quy trình tự nhiên ở động vật nhai lại. Do vậy, sự sinh metan không được coi là nguyên nhân gây chướng hơi và việc giảm metan không thể được coi là phương pháp điều trị chướng hơi. Phương pháp

điều trị tình trạng chướng hơi nhằm đến việc ngăn ngừa hoặc loại bỏ sự tạo thành lớp bọt trong dạ cỏ, chứ không ngăn ngừa quá trình tạo ra các chất khí trong dạ cỏ. Hơn nữa, cacbon đioxit là khí chủ yếu được sinh ra trong quá trình lên men ở dạ cỏ. Do vậy, phương pháp theo sáng chế không phải là phương pháp dự định hay thích hợp để điều trị tình trạng chướng hơi hoặc để giảm các triệu chứng của chúng.

Do đó, phương pháp theo sáng chế không phải là phương pháp điều trị bệnh, tức là phương pháp này không cải thiện sức khỏe của động vật mắc tình trạng bệnh cụ thể và không ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh cụ thể, hay nói cách khác nó không tác động ở mức độ bất kỳ đến sức khỏe của động vật nhai lại theo cách khác bất kỳ, nghĩa là so với động vật nhai lại không được tiếp nhận phương pháp theo sáng chế. Ưu điểm của phương pháp theo sáng chế không bị hạn chế bởi các khía cạnh môi trường và/hoặc kinh tế như đã giải thích ở trên.

Về mặt phân loại, động vật nhai lại là động vật có vú thuộc bộ *Artiodactyla* tiêu thụ thức ăn có nguồn gốc thực vật bằng cách làm mềm sơ bộ thức ăn trong dạ dày trước của động vật, được gọi là dạ cỏ, sau đó ợ ra sinh khối đã tiêu hóa một phần, được gọi là nhai lại, và tiêu hóa thức ăn này một lần nữa. Quá trình nhai lại để phân cắt tiếp nguyên liệu thực vật và kích thích tiêu hóa được gọi là "nhai lại". Động vật có vú nhai lại bao gồm gia súc, dê, cừu, hươu cao cổ, bò rừng bizong, bò Tây tạng, trâu, nai, lạc đà, lạc đà Alpaca, lạc đà không bướu, linh dương đầu bò, linh dương và linh dương ningnai. Sáng chế tập trung chủ yếu vào các phương pháp điều trị động vật nhai lại được thuần dưỡng, đặc biệt là chúng được nuôi để nhân giống vật nuôi thương mại. Do đó, theo một phương án ưu tiên của theo sáng chế, động vật nhai lại được chọn từ nhóm bao gồm gia súc, dê, cừu và trâu.

Một phương án ưu tiên của sáng chế đề cập đến phương pháp như được xác định ở trên, trong đó hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat được dùng cho động vật nhai lại ở lượng để cung cấp tổng lượng nitrat và sulphat nhiều hơn 0,05g/kg cân nặng mỗi ngày. Theo một phương án ưu tiên, tổng lượng nitrat và sulphat trong phương pháp theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10g/kg cân nặng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,2 đến 2,5g/kg cân nặng mỗi ngày.

Theo một phương án được ưu tiên khác, phương pháp được xác định ở trên được đề xuất, trong đó lượng sulphat nằm trong khoảng từ 0,025 đến 1,8g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,9g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,45g/kg cân nặng mỗi ngày.

Theo một phương án được ưu tiên khác, phương pháp được xác định ở trên được đề xuất, trong đó lượng nitrat nằm trong khoảng từ 0,025 đến 8g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 4g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2g/kg cân nặng mỗi ngày.

Liều lượng được xác định ở đây là lượng tính trên mỗi kg cân nặng mỗi ngày liên quan đến lượng trung bình của hợp chất tương ứng trong khoảng thời gian điều trị xác định, ví dụ trong vòng một tuần hoặc một tháng điều trị. Vì thế, các hợp chất này có thể được dùng mỗi ngày, cách ngày, hai ngày một lần, v.v., mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Tốt hơn là, phương pháp này gồm việc sử dụng hàng ngày hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat với lượng định trước. Tốt hơn nữa là, hỗn hợp này được dùng mỗi khi cho động vật ăn, với lượng tạo ra liều lượng hàng ngày nêu trên.

Như đã được giải thích ở trên, khả năng khử nitrat thành nitrit trong cơ thể động vật của vi thực vật dạ cỏ mà trước đó không thích ứng với nitrat trong khẩu phần ăn của nó mạnh hơn khả năng khử nitrit thành amoniac. Điều này có thể dẫn đến sự tích tụ nitrit thực tế trong dạ cỏ, mà dễ dàng được hấp thụ qua thành dạ cỏ và chuyển hóa hemoglobin huyết từ dạng sắt (II) thành sắt (III), methemoglobin, khiến cho phân tử hemoglobin không có khả năng vận chuyển oxy tới các mô. Tình trạng thu được từ đó, methemoglobin huyết, là tình trạng thiếu oxy huyết tổng quát, mà trong trường hợp nhẹ có thể làm giảm năng suất của động vật, còn trong trường hợp nghiêm trọng hơn có thể gây chết cho động vật. Tác giả sáng chế đã chứng tỏ rằng, theo một phương pháp theo sáng chế, việc đưa nitrat một cách cẩn thận, từng bước vào khẩu phần ăn của cừu cho phép vi thực vật dạ cỏ thích ứng được và tăng khả năng khử cả nitrat và nitrit của chúng. Cừu được thích ứng từ từ với khẩu phần ăn giàu nitrat, đã cho thấy là không xuất hiện các dấu hiệu lâm sàng của chứng methemoglobin huyết. Do đó, theo một phương án ưu tiên của sáng chế, phương pháp này bao gồm giai đoạn thứ nhất là làm thích ứng với nitrat và giai đoạn thứ hai là xử lý tiếp, giai đoạn thứ nhất diễn ra

trong khoảng thời gian bao gồm hai hoặc nhiều hơn hai, tốt hơn là ba hoặc nhiều hơn ba, khoảng thời gian liên tiếp ít nhất là 3 ngày, tốt hơn là ít nhất 4 ngày, tốt nhất là ít nhất 5 ngày, trong đó liều lượng nitrat hàng ngày trung bình trong mỗi khoảng thời gian thấp hơn 100% liều lượng hàng ngày trung bình được dùng trong giai đoạn thứ hai và trong đó liều lượng hàng ngày trung bình trong mỗi khoảng thời gian nhiều hơn liều lượng hàng ngày trung bình trong khoảng thời gian trước đó. Theo một phương án ưu tiên, việc tăng liều lượng nitrat hàng ngày trung bình từ một giai đoạn đến giai đoạn tiếp theo ít hơn 1g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt hơn là ít hơn 0,5, tốt hơn nữa là ít hơn 0,25, tốt nhất là ít hơn 0,1g/kg cân nặng mỗi ngày. Tốt hơn là, giai đoạn thứ hai bao gồm khoảng thời gian dùng hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat không dài hơn 5, 10, 25, 50, 100, 250 hoặc 350 ngày với liều lượng hàng ngày trung bình nằm trong khoảng từ 0,15 đến 3g/kg cân nặng.

Các phương pháp được xác định ở trên, có hoặc không có giai đoạn thích nghi ban đầu, theo một phương án ưu tiên, còn bao gồm bước cho động vật nhai lại dùng vi sinh vật có lợi khử nitrit với lượng như được xác định ở trên. Đặc biệt ưu tiên nếu vi sinh vật có lợi được dùng với lượng nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^5$ đến $1,0 \times 10^{14}$ cfu/kg cân nặng mỗi ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^7$ đến $1,0 \times 10^{13}$ cfu/kg cân nặng mỗi ngày, tốt nhất là nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{12}$ cfu/kg cân nặng mỗi ngày. Theo một phương án ưu tiên, phương pháp này gồm bước sử dụng vi sinh vật có lợi và axit lactic hoặc lactat. Đặc biệt ưu tiên nếu axit lactic hoặc lactat được dùng với lượng ít nhất bằng 0,025g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,5g/kg cân nặng mỗi ngày.

Phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm bước sử dụng hỗn hợp của hợp chất nitrat, hợp chất sulphat và, tùy ý, vi sinh vật có lợi khử nitrit theo chế độ liều được mô tả trên đây trong khoảng thời gian ít nhất 5, 10, 25, 50, 100, 250 hoặc 350 ngày. Như đã lưu ý ở trên, một khía cạnh quan tâm của sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra hiệu quả lâu dài trong việc làm giảm sự sinh metan trong ruột, tức là hiệu quả này không giảm trong khoảng thời gian điều trị kéo dài, ví dụ do tính kháng vi sinh vật trong dạ cỏ hoặc trong ruột tăng, nhờ đó có thể điều trị dài hạn cho động vật nhai lại.

Như đã nêu trên, phương pháp theo sáng chế gồm bước dùng qua đường miệng hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat và, tùy ý, vi sinh vật có lợi khử nitrit. Tốt hơn là, việc điều trị này gồm bước dùng qua đường miệng chế phẩm thức ăn chăn nuôi dạng hỗn hợp và/hoặc sản phẩm thức ăn bổ sung trong chăn nuôi như được xác định ở trên, ngay cả khi chế phẩm ăn được qua đường miệng có dạng lỏng, rắn hoặc bán rắn khác có thể được dùng mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế, như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo phần mô tả ở trên, sáng chế còn mô tả việc dùng chế phẩm chứa hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat để làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại theo cách không phải là điều trị bệnh. Tốt hơn là, cho động vật nhai lại dùng hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat với lượng để cung cấp tổng lượng nitrat và sulphat nhiều hơn 0,05g/kg cân nặng mỗi ngày. Tốt hơn là, hợp chất nitrat và hợp chất sulphat được dùng với các liều lượng đã nêu ở trên. Theo một phương án được ưu tiên khác, việc sử dụng này còn bao gồm bước cho động vật nhai lại dùng một lượng vi sinh vật có lợi khử nitrit như được nêu trong bản mô tả này. Tốt hơn nữa là, việc sử dụng một trong số các chế phẩm như được xác định ở trên là để làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại theo cách không phải là điều trị bệnh.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho động vật nhai lại đã được bổ sung nitrat. Như đã được giải thích ở trên, đã biết rằng việc bổ sung nitrat cho động vật nhai lại sẽ dẫn đến làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột nhưng cũng tăng nguy cơ hoặc tỷ lệ tích tụ nitrit, còn gọi là ‘hội chứng ngộ độc nitrat’ và/hoặc chứng methemoglobin huyết, làm giảm khả năng vận chuyển oxy đến mô động vật của máu. Ngoài ra, sự tích tụ nitrit trong dạ cỏ được biết là làm giảm hoạt tính của vi khuẩn trong dạ cỏ, mà, không kể những cái khác, có thể giảm khả năng hấp thụ thức ăn của động vật. Như đã được giải thích ở trên, các tác giả sáng chế đã chứng tỏ rằng việc cho động vật nhai lại đã bổ sung nitrat sử dụng hợp chất sulphat, tốt hơn là kết hợp với vi sinh vật có lợi khử nitrit, làm giảm hoặc ngăn ngừa đáng kể các tác dụng bất lợi này.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa sự tích tụ nitrit, ‘hội chứng ngộ độc nitrat’ và/hoặc chứng methemoglobin huyết

ở động vật nhai lại đã được bổ sung nitrat, bao gồm bước cho động vật nhai lại dùng hợp chất sulphat với lượng hữu hiệu, tùy ý kết hợp với lượng hữu hiệu vi sinh vật có lợi khử nitrit.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất sulphat, tùy ý kết hợp với vi sinh vật có lợi khử nitrit, dùng để điều trị hoặc ngăn ngừa sự tích tụ nitrit, ‘hội chứng ngộ độc nitrat’ và/hoặc chứng methemoglobin huyết ở động vật nhai lại đã được bổ sung nitrat.

Một khía cạnh khác của sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất sulphat, tùy ý kết hợp với vi sinh vật có lợi khử nitrit, để sản xuất chế phẩm dùng trong phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa sự tích tụ nitrit, ‘hội chứng ngộ độc nitrat’ và/hoặc chứng methemoglobin huyết ở động vật nhai lại đã được bổ sung nitrat.

Theo phần mô tả nêu trên, phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự tích tụ nitrit, ‘hội chứng ngộ độc nitrat’ và/hoặc chứng methemoglobin huyết, thường bao gồm bước dùng chế phẩm theo sáng chế với lượng đủ để cung cấp tổng lượng sulphat nằm trong khoảng từ 0,025 đến 1,8g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,9g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,45g/kg cân nặng mỗi ngày, và tùy ý, tổng lượng vi sinh vật có lợi nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^5$ đến $1,0 \times 10^{14}$ cfu/kg cân nặng mỗi ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^7$ đến $1,0 \times 10^{13}$ cfu/kg cân nặng mỗi ngày, tốt nhất là nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^9$ đến $1,0 \times 10^{12}$ cfu/kg cân nặng mỗi ngày. Theo một phương án ưu tiên, phương pháp gồm bước dùng vi sinh vật có lợi và axit lactic hoặc lactat. Đặc biệt ưu tiên việc sử dụng axit lactic hoặc lactat với lượng ít nhất bằng 0,025g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,5g/kg cân nặng mỗi ngày.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ ‘động vật nhai lại đã được bổ sung nitrat’ được dùng để chỉ động vật nhai lại được nhận một lượng nitrat đáng kể, thường qua thức ăn. Tốt hơn là, động vật nhai lại đã được bổ sung nitrat với lượng đủ để làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột, tốt hơn nữa là với lượng nhiều hơn 0,025g/kg cân nặng mỗi ngày, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 8g/kg cân nặng mỗi ngày. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng phương pháp này có thể thích

hợp để xử lý hoặc ngăn ngừa sự tích tụ nitrit, ‘hội chứng ngộ độc nitrat’ và/hoặc chứng methemoglobin huyết ở động vật nhai lại đã tiếp nhận lượng nitrat đáng kể cho các mục đích khác hoặc thậm chí mục đích không định trước, ví dụ do các điều kiện môi trường.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế như được xác định trên đây sẽ được minh họa và được giải thích một cách chi tiết hơn trong phần thử nghiệm dưới đây. Nên hiểu rằng các ví dụ này không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1: Nitrat và sulphat trong việc làm giảm metan

Nguyên liệu và phương pháp

Động vật và chuồng nuôi

Trong thử nghiệm này, các tính chất khử metan của nitrat và sulphat trong khẩu phần ăn được đánh giá. Cả nitrat và sulphat được bổ sung từ từ vào khẩu phần ăn trong khoảng thời gian thích nghi 4 tuần. Sự hấp thụ thức ăn và sự tăng trưởng được theo dõi trong quá trình thử nghiệm. Giả sử rằng cả nitrat và sulphat trong khẩu phần ăn đều sẽ làm giảm sự giải phóng metan từ quá trình lên men trong đường ruột.

Ủy ban sử dụng và chăm sóc động vật (Animal Care and Use Committee) thuộc nhóm nghiên cứu động vật (Animal Sciences Group), WUR, Lelystad đã phê chuẩn quy trình thử nghiệm này. Tiến hành thử nghiệm trên 20 con cừu đực Texel Cross, có cân nặng $42,9 \pm 4,3\text{kg}$ (giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn) ở thời điểm bắt đầu thử nghiệm. Trong giai đoạn thích nghi 4 tuần với chất phụ gia trong khẩu phần ăn, cừu được nhốt vào các chuồng riêng biệt để cho ăn riêng. Cừu được cân hàng tuần để kiểm soát sự tăng trưởng trong quá trình thử nghiệm.

Sau giai đoạn thích nghi, bốn con cừu (một nhóm) được nhốt vào trong buồng đo nhiệt lượng hô hấp gián tiếp trong một tuần để xác định sự trao đổi khí. Trong tuần tiếp theo, nhóm cừu mới được đưa vào các buồng này mỗi tuần. Mỗi buồng hô hấp được nhốt các cừu riêng rẽ. Các buồng đo nhiệt lượng hô hấp được dùng đã được mô tả chi tiết trong Verstegen et al. (1987). Nhiệt độ được giữ ở 15°C và độ ẩm tương đối bằng 70%. Tốc độ thông gió bằng 70l/phút ở một loại buồng và 90l/phút ở loại còn lại.

Không khí đi vào và đi ra từ các buồng này được phân tích CO_2 , O_2 và CH_4 trong khoảng thời gian 9 phút. Lượng sản sinh hoặc tiêu thụ tinh các khí này được tính toán từ sự khác nhau về nồng độ giữa không khí bên trong và bên ngoài tăng theo luồng khí và sau đó được tính toán lại theo điều kiện tiêu chuẩn (0°C , 101 kPa, không có hơi nước).

Thiết kế thử nghiệm

Thử nghiệm được thiết kế dưới dạng thiết kế nhân tố 2×2 , với nitrat và sulphat làm các nhân tố. Động vật thử nghiệm được nhóm theo trọng lượng, sau đó trong một nhóm được phân phối ngẫu nhiên một trong số bốn nhóm khẩu phần ăn: CON, NO_3 , SO_4 hoặc $\text{NO}_3 + \text{SO}_4$.

Thức ăn

Khẩu phần ăn cơ bản gồm 74% ngô ủ chua, 16% rơm lúa mạch được cắt ngắn, 9% bột đậu tương được xử lý formaldehyt và 1% hỗn hợp khoáng sơ chế trên cơ sở chất khô (DM). Các chất phụ gia trong khẩu phần ăn được bao gồm trong hỗn hợp sơ chế (bảng 1) được bổ sung vào khẩu phần ăn cơ bản ở 10% DM trong khẩu phần ăn. Khi cho ăn, các hỗn hợp sơ chế được trộn bằng tay vào khẩu phần ăn. Nước được bổ sung tùy ý trong quá trình thử nghiệm. Nitrat được bổ sung từ các nguồn có trên thị trường (Calcinit, Yara) và SO_4 bổ sung được thêm vào khẩu phần ăn dưới dạng MgSO_4 khan.

Trong giai đoạn thích nghi, các con cừu được cho ăn hỗn hợp sơ chế thử nghiệm trong các bước với lượng 25% mỗi tuần. Các con cừu non được cho ăn một lần mỗi ngày vào lúc 8h30. Trước khi ăn sáng, thức ăn thừa được lấy ra khỏi máng chứa thức ăn và được cân để xác định lượng hấp thụ thức ăn tự nguyện. Trong tuần ở trong buồng hô hấp, tính khả dụng của thức ăn được hạn chế đến 95% thức ăn được tiêu thụ bởi động vật tiêu thụ thức ăn tối thiểu trong nhóm trong tuần trước khi nuôi nhốt trong buồng hô hấp. Việc hạn chế thức ăn được áp dụng để tránh sự tương tác giữa sự ảnh hưởng của các chất phụ gia lên sự hấp thụ chất khô (DMI) và sự ảnh hưởng lên sự sinh metan.

Nitrat trong khẩu phần ăn thử nghiệm được thay đổi thành ure trong khẩu phần ăn đối chứng để duy trì khẩu phần ăn có isonitơ. Bổ sung đá vôi vào khẩu phần ăn đối

chúng để đảm bảo sự hấp thụ canxi cân bằng giữa các nhóm xử lý. MgO được bao gồm trong khẩu phần ăn để có hàm lượng Mg tương tự giữa các khẩu phần ăn. Lượng của các chất bổ sung khác nhau vào các khẩu phần ăn là khác nhau với mỗi thử nghiệm, và xenluloza gỗ được dùng để cân bằng lượng này.

Bảng 1: Thành phần của hỗn hợp chứa chất phụ gia thử nghiệm (% DM)

	CON	NO ₃	SO ₄	NO ₃ + SO ₄
Bột đậu tương được xử lý formaldehyt	22	22	22	22
Ure	15		15	
Nguồn nitrat ²		38		38
MgSO ₄ (khan)			33	33
MgO	13	13		
CaCO ₃	22		22	
Xenluloza gỗ	28	27	8	7
Nitrat thêm vào trong khẩu phần ăn	0	2,9	0	2,9
Sulphat thêm vào trong khẩu phần ăn	0	0	0,7	0,7

²công thức hóa học 5Ca(NO₃)₂·NH₄NO₃·10H₂O

Lấy mẫu máu, dạ cỏ và gan

Máu được lấy mẫu vào ngày 2, ngày 8, ngày 15, ngày 22 và ngày 28 ở thời điểm 1, 3 và 5 giờ sau khi ăn. Các ngày 2, 8, 15 và 22 đều là 1 ngày sau bước tăng thêm 25% hỗn hợp sơ chế thử nghiệm trong khẩu phần ăn. Vào ngày 28, cừu non được cho ăn 100% khẩu phần ăn thử nghiệm trong một tuần. Các mẫu máu được lấy vào ống gom chứa heparin (Vacutainers) và được bảo quản trong tủ lạnh ngay sau khi lấy mẫu. Vào cuối ngày lấy mẫu, mẫu được gửi đi phân tích và được phân tích vào ngày tiếp theo. Nồng độ methemoglobin trong máu được xác định bằng các phương pháp nêu trong ấn phẩm của Evelyn và Malloy (1938).

Sau khi hoàn tất giai đoạn trong buồng hô hấp, cừu được mổ và các mẫu dịch dạ cỏ (200ml) được lấy ra từ dạ cỏ càng sớm càng tốt sau khi mổ. Các mẫu được ngâm trực tiếp trong nước đá sau khi lấy mẫu để làm ngừng quá trình lên men vi khuẩn và được làm đông lạnh khi toàn bộ mẫu lấy được. Tại thời điểm mổ, lấy hai mẫu gan, nghiền và làm đông lạnh để đánh giá tình trạng vitamin A sau này.

Kết quả và thảo luận

Hàm lượng methemoglobin trong máu trong thời gian thích nghi

Trong quá trình bổ sung khẩu phần ăn với tỷ lệ phối trộn hỗn hợp sơ chế cuối cùng là 25% hoặc 50%, không có con cừu nào có hàm lượng MetHb huyết tích cực (< 2% Hb). Khi tỷ lệ phối trộn bằng 75% được bao gồm trong khẩu phần ăn, một con cừu ăn khẩu phần ăn NO_3 có kết quả tích cực tại thời điểm 3 giờ sau khi ăn, nhưng giá trị này chỉ là 3% Hb. Khi các con cừu được ăn khẩu phần ăn có tỷ lệ phối trộn 100% trong một tuần (ngày 28), hai con cừu trong nhóm xử lý NO_3 có kết quả tích cực với giá trị MetHb lần lượt là 7% Hb và 3% Hb tại thời điểm 3 giờ sau khi ăn. Các con cừu ăn khẩu phần ăn đối chứng và cả hai khẩu phần ăn bổ sung sulphat đều không có hàm lượng MetHb cao hơn 2% Hb (giới hạn phát hiện), có thể chỉ ra rằng lưu huỳnh đóng vai trò quan trọng trong việc khử nitrit trong dạ cỏ.

Giai đoạn thích nghi 4 tuần rõ ràng là đủ để ngăn ngừa các vấn đề đáng kể bất kỳ liên quan đến ngộ độc nitrit và methemoglobin huyết. Phát hiện tương tự được thông báo bởi Alaboudi và Jones (1985). Hàm lượng nitrat bằng 2,9% DM được coi là gây chết với động vật nhai lại không thích nghi, nhưng việc thích nghi rõ ràng là cho phép vi khuẩn dạ cỏ tăng khả năng khử nitrit của chúng.

Sự hấp thụ thức ăn và sự tăng trưởng trong quá trình thích nghi với nitrat và sulphat trong khẩu phần ăn

Sự hấp thụ thức ăn không khác nhau khi bổ sung NO_3 hoặc SO_4 (bảng 2), nhưng có xu hướng giảm khi cung cấp lượng đầy đủ nitrat. Tuy nhiên, đối với các phối trộn nhiều hơn 25% tỷ lệ phối trộn cuối cùng, sự hấp thụ thức ăn được giảm tương ứng (khoảng 9% trong khoảng thời gian sau tuần 1) là kết quả của việc phối trộn NO_3 . Việc sử dụng ít động vật trong thử nghiệm này gây trở ngại cho việc đưa ra kết luận về sự ảnh hưởng đến sự hấp thụ thức ăn, nhưng sự hấp thụ thức ăn ít hơn phù hợp không nên bỏ qua. Bruning-Fann và Kaneene (1993) thông báo rằng ở các con cừu, phản ứng tiêu cực về sự hấp thụ thức ăn được quan sát thấy khi hàm lượng nitrat trong khẩu phần ăn nhiều hơn 3% DM trong khẩu phần ăn. Việc giảm sự hấp thụ thức ăn có thể liên quan tới việc ức chế sự phân hủy thành tế bào gây ra bởi nitrit như đã được chứng minh *in vitro* bởi Marais et al. (1988).

Việc cho ăn NO_3 hoặc SO_4 không ảnh hưởng đến sự tăng trọng (bảng 3).

Bảng 2: Sự hấp thụ thức ăn (g/cừu non/ngày) trong giai đoạn thích nghi 4 tuần đối với các chất phụ gia trong khẩu phần ăn

	Tác dụng chính								Sự tương tác	
	Nitrat				Sulphat				Nitrat*Sulphat	
	Không	Có	Giá trị P	Sai số chuẩn trung bình	Không	Có	Giá trị P	Sai số chuẩn trung bình	Giá trị P	Sai số chuẩn trung bình
Tuần 1	2682	2686	0,995	85,7	2644	2724	0,500	84,2	0,112	118,6
Tuần 2	2836	2591	0,105	100,7	2657	2770	0,425	98,9	0,156	139,3
Tuần 3	2741	2526	0,177	103,8	2650	2618	0,836	102,0	0,39	143,7
Tuần 4	2696	2411	0,096	104,2	2650	2457	0,216	102,3	0,136	144,1

Bảng 3: Cân nặng (BW; kg/con cừu non) và tăng trọng (BWG; kg/con cừu non/tuần) trong giai đoạn thích nghi với các chất phụ gia trong khẩu phần ăn

	Tác dụng chính								Sự tương tác	
	Nitrat				Sulphat				Nitrat*Sulphat	
	Không	Có	Giá trị P	Sai số chuẩn trung bình	Không	Có	Giá trị P	Sai số chuẩn trung bình	Giá trị P	Sai số chuẩn trung bình
BW ngày 0	42,7	43,0	0,605	0,51	43,2	42,4	0,285	0,51	0,433	0,72
BW ngày 7	43,8	43,6	0,810	0,55	44,2	43,1	0,199	0,55	0,137	0,77
BW ngày 14	44,9	44,7	0,741	0,57	45,2	44,3	0,287	0,57	0,176	0,80
BW ngày 21	45,2	45,2	0,985	0,72	45,7	44,7	0,336	0,72	0,240	1,08
BW ngày 28	45,7	45,5	0,858	0,81	46,4	44,8	0,182	0,81	0,346	1,15

BWG tuần 1	1,11	0,54	0,363	0,426	0,95	0,70	0,685	0,426	0,685	0,602
BWG tuần 2	1,16	1,08	0,815	0,236	1,04	1,20	0,641	0,236	0,815	0,334
BWG tuần 3	0,30	0,59	0,482	0,282	0,51	0,38	0,750	0,399	0,788	0,399
BWG tuần 4	0,48	0,25	0,715	0,436	0,67	0,06	0,342	0,436	0,836	0,616
BWG tổng	3,05	2,46	0,508	0,611	3,17	2,34	0,356	0,611	0,356	0,864

Bảng 4: Sự hấp thụ thức ăn, trao đổi khí và sinh nhiệt trong tuần được nhốt trong buồng hô hấp

	Tác dụng chính								Sự tương tác	
	Nitrat				Sulphat				Nitrat*Sulphat	
	Không	Có	Giá trị P	Sai số chuẩn trung bình	Không	Có	Giá trị P	Sai số chuẩn trung bình	Giá trị P	Sai số chuẩn trung bình
Hấp thụ thức ăn (g/cừ non/ngày)	2,39	2,38	0,782	0,02	2,39	2,38	0,631	0,020	0,350	0,03
Sự sinh metan (l/cừ non /ngày)	23,5	15,4	<0,001	1,06	21,5	17,5	0,02	1,06	0,94	1,50
Sự sinh metan (l/kg ^{0,75} /ngày)	1,4	0,9	<0,001	0,07	1,3	1,0	0,05	0,07	0,90	0,10
Sự sinh metan (l/kg hấp thụ thức ăn/ngày)	9,85	6,53	<0,001	0,44	8,99	7,4	0,025	0,44	0,91	0,62
Sinh CO ₂ (l/kg ^{0,75} /ngày)	26,1	24,9	0,03	0,345	25,0	26,1	0,043	0,345	0,487	0,49
Tiêu thụ O ₂ (l/kg ^{0,75} /ngày)	26,6	25,0	0,006	0,339	25,2	26,3	0,038	0,339	0,552	0,48
Sinh nhiệt (kJ/kg ^{0,75} /ngày)	558	527	0,008	6,9	531	555	0,03	6,9	0,517	9,75

Tác dụng của NO₃ và SO₄ đối với sự trao đổi khí

Dòng khí được xác định trong buồng hô hấp được thể hiện trong bảng 4.

Việc cho ăn hạn chế được áp dụng trong phần thử nghiệm này dẫn đến sự hấp thụ thức ăn tương tự nhau giữa các nhóm xử lý. Lượng sinh metan được giảm 34% là kết quả của việc bổ sung nguồn nitrat vào khẩu phần ăn.

Các con cừu trong thử nghiệm NO_3 đã tiêu thụ trung bình 24,9g NO_3 mỗi ngày, mà theo lý thuyết là sẽ làm giảm lượng sinh metan 6,4g. Việc giảm lượng sinh metan thực tế ở nhóm xử lý NO_3 là 8,1 l, tương ứng với 5,8g CH_4 ($\text{CH}_4 = 0,714\text{g/l}$). Như vậy, sự giảm lượng sinh metan trên thực tế ở mức độ nào đó là ít hơn có thể được giải thích theo hệ số tỷ lệ, mà có thể được giải thích bởi sự khử không hoàn toàn nitrat thành amoniac hoặc sử dụng nitrat trong các quá trình khác ngoài quá trình khử nitrat dị hóa. Nguồn nitrat được dùng trong nghiên cứu này có khả năng hòa tan cao tan và do đó có thể là hầu hết nitrat đều khả dụng cho quá trình khử trong dạ cỏ. Tuy nhiên, hầu hết nitrat hòa tan sẽ ở trong pha lỏng của dạ cỏ và có thể đi qua dạ cỏ trước khi được khử.

Việc bổ sung sulphat dẫn đến sự giảm 19% lượng sinh metan mỗi ngày.

Trong nghiên cứu của các tác giả sáng chế, các con cừu trong nhóm xử lý SO_4 tiêu thụ trung bình 27,0g SO_4 /ngày, tương ứng với sự giảm 4,5g metan. Việc giảm sự khử metan quan sát được thực tế là 4 l, hoặc 2,9g. Sự khác nhau về khả năng để SO_4 dùng làm nguồn hydro về lý thuyết và khả năng quan sát được của nó trong việc làm giảm mức giải phóng metan có thể là do khả năng hòa tan của MgSO_4 trong dạ cỏ.

Các con cừu trong nhóm xử lý SO_4 được cho ăn một lượng lớn lưu huỳnh trong khẩu phần ăn (7,4g lưu huỳnh bổ sung/kg DM). Hàm lượng này cao hơn lượng khuyến nghị tối đa như được chỉ ra bởi NRC (4g/kg DM). Việc cho ăn cao hơn giới hạn trên này làm tăng nguy cơ mắc bệnh nhũn não, do hàm lượng H_2S cao tồn tại trong khoảng trống phía trên trong dạ cỏ và sự hít phải H_2S sau đó. Tuy nhiên, kết quả thu được từ thử nghiệm này đã thể hiện rằng SO_4 hữu hiệu trong việc làm giảm lượng sinh metan. Khi được cho ăn trong hàm lượng được khuyến dùng (từ 2 đến 4g lưu huỳnh/kg DM), được mong đợi là SO_4 sẽ vẫn có tác dụng làm giảm lượng sinh metan.

Việc tiêu thụ oxy và sinh ra CO_2 đều ít hơn do xử lý nitrat. Lượng nitrat cao trong khẩu phần ăn của động vật nhai lại được báo cáo là gây chứng methemoglobin huyết, làm giảm khả năng vận chuyển oxy của máu đến các mô của động vật. Tuy nhiên, trong thử nghiệm này, các mẫu máu được lấy theo nguyên tắc cơ bản và hàm lượng

MetHb tăng nhẹ chỉ được phát hiện ở hai con cừu (hàm lượng tối đa là 7% Hb) và có vẻ không giải thích được mức tiêu thụ O_2 ít hơn. Mức tiêu thụ O_2 ít hơn có thể phản ánh mức độ chuyển hóa khác nhau khi nitrat được ăn vào. Sar et al.(2004) cũng quan sát thấy mức tiêu thụ O_2 giảm và lượng sinh CO_2 giảm khi 0,9g NO_3^- / kg^{0,75} BW được đưa vào dạ cỏ cừu. Trong nghiên cứu này, lượng nitrat nhiều hơn đáng kể được cho ăn (1,4g NO_3^- / kg^{0,75} BW), nhưng hàm lượng MetHb trong nghiên cứu này thấp hơn đáng kể (18,4% Hb trong nghiên cứu của Sar et al.). Điều này có thể là do không có giai đoạn thích nghi trong nghiên cứu của Sar et al. (2004) và thực tế là nitrat được đưa theo liều dưới dạng dung dịch vào dạ cỏ. Trong nghiên cứu khác (Takahashi et al., 1998) $NaNO_3$ được đưa theo liều vào dạ cỏ cừu với tỷ lệ là 1,5g/kg BW^{0,75}, rất tương tự với nồng độ được dùng trong nghiên cứu của các tác giả sáng chế. Nồng độ MetHb lên đến trên 30% được quan sát thấy và từ dữ liệu của nghiên cứu được kết luận rằng với mỗi sự tăng 10% nồng độ MetHb, mức tiêu thụ oxy giảm 10,3%. Trong nghiên cứu của các tác giả sáng chế, quan sát thấy rằng mức tiêu thụ oxy giảm 6%. Bằng cách sử dụng phương trình hồi quy, (Takahashi et al., 1998) cho thấy động vật có hàm lượng MetHb bằng khoảng 5%. Trong hai động vật, mức tương tự (3% và 7% Hb) quan sát được thực tế.

Sự sinh metan ở nhóm đối chứng là điển hình ở các con cừu được cho ăn hạn chế một lần mỗi ngày. Các con vật được cho ăn vào 8 giờ sáng, sau đó lượng sinh metan tăng lũy tiến đến lượng sinh metan tối đa vào thời điểm 5 đến 6 giờ sau khi ăn. Vì các con vật được cho ăn hạn chế và chỉ được ăn một lần mỗi ngày, nên lượng sinh metan giảm liên tục sau khi đạt đỉnh. Việc bổ sung nitrat vào khẩu phần ăn đã gây ra kiểu sinh metan khác nhau đáng kể; ngay sau khi cho ăn, tốc độ sinh metan được giữ ở mức thấp hơn nhiều và được giả sử rằng trong giai đoạn này, hydro được dùng để khử nitrat, nhờ đó hạn chế tính khả dụng của H_2 trong sự sinh metan. 10 giờ sau khi cho ăn, tốc độ sinh metan không khác biệt với nhóm đối chứng nữa, có thể phản ánh sự vắng mặt của thức ăn chứa nitrat và trở lại quá trình sinh metan dưới dạng bề H. Mặc dù lượng sinh metan ít hơn đáng kể sau khi cho ăn do nitrat được cho ăn, lượng sinh metan không bao giờ giảm xuống đến 0 và việc khử nitrat và sinh metan diễn ra đồng thời. Lượng sinh khí metan cơ bản có thể ít nhất được giải thích một phần bởi sự sinh metan từ sự lên men ở ruột sau. Không có khả năng nitrat đến được ruột sau mà không

bị khử và do đó, việc cho ăn nitrat sẽ không ảnh hưởng đến sự sinh metan trong phần này của đường dạ dày-ruột.

Tốc độ sinh metan trong nhóm xử lý SO_4 không khác với nhóm đối chứng nhưng thấp hơn nhóm đối chứng trong toàn bộ giai đoạn 24 giờ. Kết quả tương tự được quan sát khi so sánh nhóm xử lý SO_4 với nhóm xử lý $\text{NO}_3 + \text{SO}_4$. Rõ ràng là, tác dụng của NO_3 và SO_4 đối với sự sinh metan là đáng kể và tác dụng của SO_4 dường như ít phụ thuộc vào tính khả dụng của thức ăn chứa SO_4 .

Kết quả thử nghiệm cũng được mô tả trên đồ thị của Fig.1, thể hiện lượng sinh metan (l/giờ) trong khoảng thời gian 24 giờ ở các nhóm tiếp nhận khẩu phần ăn cơ bản hoặc một trong số ba khẩu phần ăn thử nghiệm.

Mức tiêu thụ oxy trong khoảng thời gian của giai đoạn 24 giờ

Ngay sau khi cho ăn vào lúc 8 giờ sáng, mức tiêu thụ oxy nằm trong khoảng từ 10% đến 18% thấp hơn với nhóm xử lý NO_3 . Sự khác nhau về mức tiêu thụ oxy giữa các nhóm xử lý không thể hiện sau 4 giờ chiều. Hiện tượng này trùng khớp với sự sinh metan giảm đáng kể trong giai đoạn sau khi cho ăn với nhóm xử lý NO_3 . Giả sử rằng trong giai đoạn này việc khử phần lớn nitrat diễn ra trong dạ cỏ, cùng với việc tạo ra nitrit dưới dạng hợp chất trung gian ở nhóm xử lý NO_3 . Sự có mặt của nitrit trong giai đoạn này có thể giải thích cho mức tiêu thụ oxy thấp của nhóm xử lý NO_3 . Mặc dù hàm lượng MetHb vượt 7% Hb không được quan sát thấy ở nhóm xử lý NO_3 , sự giảm rõ ràng mức tiêu thụ oxy vẫn quan sát được. Thời gian bảo quản mẫu (các mẫu được phân tích trong khoảng 24 giờ sau khi lấy mẫu) có thể giải thích cho việc hàm lượng MetHb thấp hơn mong đợi.

Ở nhóm xử lý $\text{NO}_3 + \text{SO}_4$, mức tiêu thụ oxy chỉ giảm ngay sau khi cho ăn (9 giờ sáng) và được khôi phục đến hàm lượng tương tự như mẫu đối chứng sau thời điểm này. Việc bổ sung SO_4 rõ ràng làm giảm bớt sự giảm tiêu thụ oxy gây ra bởi việc cho ăn nitrat. Có thể là, SO_4 bị khử thành H_2S trong giai đoạn ngay sau khi cho ăn và đóng vai trò thúc đẩy việc khử nitrit như đã nêu trên. Việc thúc đẩy sự khử nitrit phụ thuộc liều lượng rõ ràng đã được phát hiện trước đây khi sulphua được thêm vào dịch dạ cỏ *in vitro* (Takahashi et al., 1989). Việc thúc đẩy sự khử nitrit thấp hơn nhiều khi SO_4

được thêm vào môi trường này và do vậy có vẻ hợp lý khi nó là H_2S , mà khôi phục tích cực mức tiêu thụ oxy trong thử nghiệm.

Kết quả thử nghiệm cũng được mô tả trên đồ thị của Fig.2, thể hiện mức tiêu thụ oxy (l/kg MW/giờ) trong khoảng thời gian của giai đoạn 24 giờ ở nhóm tiếp nhận khẩu phần ăn cơ bản hoặc một trong số ba khẩu phần ăn thử nghiệm.

Ví dụ 2: Tác dụng của sulphat đến chứng methemoglobin huyết ở gia súc được bổ sung nitrat

Tác dụng của việc hấp thụ sulphat trong khẩu phần ăn đến nồng độ methaemoglobin trong máu của bò đã được bổ sung nitrat được đánh giá. Giả sử rằng sulphat trong khẩu phần ăn sẽ làm giảm sự tích tụ nitrit trong dạ cỏ của bò đã được cho ăn nitrat và do đó ngăn ngừa sự tạo thành methaemoglobin trong máu.

Nguyên liệu và phương pháp

Thiết kế thử nghiệm

Thử nghiệm là thiết kế nhóm được chọn ngẫu nhiên, với 4 con vật mỗi nhóm và có liều lượng sulphat khác nhau theo các nhóm xử lý. Các con vật được phân nhóm theo năng suất sữa, sau đó trong mỗi nhóm được phân phối một cách ngẫu nhiên với một trong số bốn nhóm xử lý: NO_3 , $NO_3 + SO_4$ thấp, $NO_3 + SO_4$ trung bình, $NO_3 + SO_4$ cao.

Cho ăn

Khẩu phần ăn cơ bản bao gồm 45% ngô ủ chua, 7,5% cỏ linh lăng khô, 4,1% rơm lúa mạch được cắt ngắn, và 42% hỗn hợp sơ chế cô đặc tính theo DM. Các chất phụ gia cho khẩu phần ăn được bao gồm trong hỗn hợp sơ chế (bảng 5). Khi cho ăn, hỗn hợp sơ chế này được phân phối cho bò dưới dạng một phần của tổng khẩu phần ăn đã trộn. Nước được bổ sung tự do trong quá trình thử nghiệm. Nitrat được bổ sung từ nguồn có trên thị trường (Calcinit, Yara AS, Norway) và SO_4 bổ sung được thêm vào khẩu phần ăn dưới dạng $MgSO_4$ khan.

Bảng 5: Thành phần của hỗn hợp chứa các chất phụ gia thử nghiệm (% DM)

Nhóm xử lý	Mô tả	% chất khô			
		NO_3	Sản phẩm	SO_4	Sản phẩm

			được bổ sung		được bổ sung
A	NO ₃	3	3,96	0,15	0,00
B	NO ₃ + SO ₄ thấp	3	3,96	0,23	0,32
C	NO ₃ + SO ₄ trung bình	3	3,96	0,32	0,63
D	NO ₃ + SO ₄ cao	3	3,96	0,40	0,95

Trong giai đoạn thích nghi, các con bò được cho ăn hỗn hợp sơ chế thử nghiệm với mức 25% mỗi tuần. (Bảng 6).

Bảng 6: Thành phần hỗn hợp thử nghiệm cô đặc trong giai đoạn thích nghi

Cho ăn	%	
	Mẫu đối chứng đặc	Hỗn hợp sơ chế đặc A, B, C hoặc D
Ngày 8-14	75	25
Ngày 15-21	50	50
Ngày 22-28	25	75
Ngày 29-35	0	100

Mẫu máu

Máu được lấy vào thời điểm 3 giờ sau khi ăn hai lần mỗi tuần trong thời gian thử nghiệm để giám sát chặt chẽ nồng độ methaemoglobin. Máu được gom vào ống hút chân không chứa heparin, được nhúng ngay vào nước đá lạnh và được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C. Vào cuối mỗi ngày lấy mẫu, các mẫu được gửi đi phân tích và được phân tích vào ngày tiếp theo. Hàm lượng methaemoglobin trong máu được xác định bằng phương pháp của Evelyn và Malloy (1938). Vào ngày 37, khi nitrat được cho ăn ở tỷ lệ phối trộn tối đa (3% nitrat theo lượng DM), tiến hành lấy mẫu máu thường xuyên hơn (-0,5 giờ, 0,5 giờ, 1,5 giờ, 3 giờ, 5 giờ và 8 giờ sau khi cho ăn) để thiết lập động học của nitrat và các chất chuyển hoá khác nhau của nó trong huyết tương.

Kết quả và thảo luận

Hàm lượng methemoglobin trong máu trong giai đoạn thích nghi

Không có con bò nào được phát hiện thấy mắc chứng methaemoglobin huyết trong thời gian bổ sung khẩu phần ăn với tỷ lệ phối trộn nitrat cuối cùng là 25% hoặc 50%. Khi nitrat được thêm vào khẩu phần ăn với tỷ lệ phối trộn cuối cùng là 75%, các

con bò không được bổ sung sulphat có nồng độ haemoglobin trong máu tăng ở thời điểm 3 giờ sau khi cho ăn. Trái lại, các con bò được nhận sulphat trong khẩu phần ăn có kết quả âm tính với methaemoglobin, không phụ thuộc vào lượng S được dùng. Ở tỷ lệ phối trộn nitrat 100%, tất cả các nhóm xử lý đều thể hiện sự tăng methaemoglobin huyết, mặc dù sự tăng này dễ nhận thấy hơn ở các con bò chỉ nhận nitrat, so với các con bò được nhận cả nitrat và sulphat. Trong số các con bò được bổ sung sulphat, không thể phân biệt được tác dụng của việc dùng sulphat (xem bảng 7). Kết luận rằng sulphat có thể đẩy lùi sự tích tụ nitrit trong dạ cỏ, do đó ngăn ngừa (khi bổ sung nitrat vừa phải) hoặc làm giảm (khi bổ sung nhiều nitrat) sự tạo thành methaemoglobin trong máu.

Bảng 7: Methaemoglobin huyết (% haemoglobin)

	NO ₃	NO ₃ + SO ₄ thấp	NO ₃ + SO ₄ trung bình	NO ₃ + SO ₄ cao	Giá trị P
Methaemoglobin huyết (% haemoglobin)	13,1 ^a	2,6 ^b	6,0 ^b	4,8 ^b	0,063

Các giá trị trung bình có chỉ số trên khác nhau là khác nhau đáng kể (P<0,1)

Kết quả thử nghiệm cũng được thể hiện ở đồ thị trên Fig.3, thể hiện nồng độ methaemoglobin trong máu của các con bò tiếp nhận một trong số khẩu phần ăn thử nghiệm.

Ví dụ 3: Tác dụng của *Megasphaera elsdenii* và *Selenomonas ruminantium* đến tốc độ khử nitrat và nitrit trong mô hình lên men dạ cỏ

Trong thử nghiệm này, động học của quá trình khử nitrat trong hệ thống lên men dạ cỏ *in vitro* được nghiên cứu và tác dụng lên quá trình này của *M. elsdenii* và *S. ruminantium*.

Nguyên liệu và phương pháp

Thức ăn được dùng trong mô hình dạ cỏ là 1 gam chất khô và bao gồm cỏ ủ chua (0,5g chất khô) và thức ăn dạng hỗn hợp thương mại, 0,5g chất khô. Các nhóm xử lý được thể hiện trong bảng dưới đây:

Nhóm xử lý	Các thay đổi
------------	--------------

1.	Không thay đổi
2.	57mg Calcinit/40ml ^{*)}
3.	57mg Calcinit + 10 μ l <i>M. elsdenii</i> /40ml ^{*)}
4.	57mg Calcinit + 100 μ l <i>M. elsdenii</i> /40ml ^{*)}
5.	57mg Calcinit + 1000 μ l <i>M. elsdenii</i> /40ml ^{*)}
6.	57mg Calcinit + 10 μ l <i>M. elsdenii</i> + 100mg Na-lactat/40ml ^{*)}
7.	57mg Calcinit + 100 μ l <i>M. elsdenii</i> + 100mg Na-lactat/40ml ^{*)}
8.	57mg Calcinit + 1000 μ l <i>M. elsdenii</i> + 100mg Na-lactat/40ml ^{*)}
9.	57mg Calcinit + 10 μ l <i>M. elsdenii</i> + 200mg Na-lactat/40ml ^{*)}
10.	57mg Calcinit + 100 μ l <i>M. elsdenii</i> + 200mg Na-lactat/40ml ^{*)}
11.	57mg Calcinit + 1000 μ l <i>M. elsdenii</i> + 200mg Na-lactat/40ml ^{*)}
12.	57mg Calcinit + 100mg Na-lactat/40ml ^{*)}
13.	57mg Calcinit + 200mg Na-lactat/40ml ^{*)}
14.	57mg Calcinit + 10 μ l <i>S. ruminantium</i> /40ml ^{*)}
15.	57mg Calcinit + 100 μ l <i>S. ruminantium</i> /40ml ^{*)}
16.	57mg Calcinit + 1000 μ l <i>S. ruminantium</i> /40ml ^{*)}
17.	57mg Calcinit /40ml ^{*)}
18.	Không thay đổi

^{*)} Các nhóm xử lý từ 2 đến 17 chứa 7,52mg MgSO₄/40ml.

Tất cả các nhóm xử lý đều được chạy thành bốn mẫu, tổng số lượng bình mô phỏng là 72.

Các thành phần thức ăn khô và Calcinit được cân trong các chai huyết thanh, các chai được súc rửa bằng cách cho CO₂ đi qua chất xúc tác đồng nóng để làm sạch O₂, và, được bịt kín bằng nút cao su butyl dày. Đưa 36,5ml dung dịch đệm kỵ khí, được khử, được điều chỉnh nhiệt độ (+37°C) vào mỗi bình mô phỏng dưới luồng CO₂ không chứa oxy. Bổ sung giống cấy vi khuẩn được sinh trưởng qua đêm, dung dịch MgSO₄, dung dịch lactat và dung dịch đệm để làm tổng thể tích chất lỏng bằng 1,5ml/bình. Cuối cùng, 2 ml dịch dạ cỏ sạch, đã lọc được thêm vào các chai huyết thanh, thể tích cuối là 40ml. Việc cấy này khởi động quá trình mô phỏng môi trường dạ cỏ thật. Thời gian cấy cho mỗi bình được ghi lại và được xem xét khi lấy mẫu và ngừng lên men.

Việc mô phỏng quá trình lên men trong dạ cỏ được tiếp tục trong 12 giờ ở nhiệt độ 37°C. Trong quá trình lên men, tổng lượng khí sinh ra được đo sau 2, 4, 6, 9 và 12 giờ mô phỏng để biết được hoạt tính trao đổi chất chung của vi khuẩn trong dạ cỏ.

Toàn bộ khí sinh ra trong thời gian 12 giờ trong mỗi bình mô phỏng được gom riêng biệt từ mỗi trong số 72 bình vào các chai truyền dung tích 2 l được hút chân không, có etan được đưa vào trước làm chất nội chuẩn. Các mẫu này được phân tích nồng độ metan để đánh giá tác dụng của các xử lý lên tổng lượng metan sinh ra bởi vi khuẩn trong dạ cỏ trong suốt thời gian 12 giờ. Việc phân tích được tiến hành bằng sắc ký khí sử dụng bộ dò ion hóa ngọn lửa và metan và etan tinh khiết được dùng làm chất chuẩn.

Tại thời điểm 4 và 12 giờ, toàn bộ các bình mô phỏng được phân tích các axit béo dễ bay hơi (các VFA) và axit lactic (gọi là chung là các SCFA). Các axit được phân tích bằng sắc ký khí sử dụng cột nhồi để phân tích axit tự do. Các SCFA được xác định là axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit iso-butyric, axit 2-metylbutyric, axit valeric, axit iso-valeric và axit lactic.

NO_3 và NO_2 được phân tích từ tất cả các bình mô phỏng dạ cỏ tại thời điểm 0, 2, 4 và 12 giờ. Phương pháp được dùng là đo quang phổ và dựa trên việc khử nitrat bằng vanadi(III) kết hợp với việc dò bằng phản ứng Griess có tính axit.

NH_4 được phân tích từ tất cả các bình mô phỏng tại thời điểm 0, 2, 4 và 12 giờ. Phương pháp được dùng là đo màu và dựa trên phản ứng phenol-hypoclorit.

Phân tích thống kê bao gồm kiểm định t chặn hai đầu với tất cả các thông số được đo. Các kiểm định được tiến hành đối với nhóm xử lý với sự thay đổi Calcinit và MgSO_4 (nhóm xử lý 2 và 17). Kiểm định t được chọn để các nhóm xử lý riêng rẽ không phụ thuộc đồng thời vào các nhóm xử lý còn lại. Các kết quả được ký hiệu trên các hình vẽ, trong đó $0,01 \leq \text{giá trị } P < 0,05$ được thể hiện là: *; $0,001 \leq \text{giá trị } P < 0,01$ được thể hiện là: **; $0,0001 \leq \text{giá trị } P < 0,001$ được thể hiện là: ***; và giá trị $P < 0,0001$ được thể hiện là: ****.

Kết quả

Tác dụng của các xử lý đối với tổng lượng khí sinh ra

Trong thử nghiệm này, các tác giả sáng chế đã cấy 5% dịch dạ cỏ vào tất cả các bình, nhưng ngoài ra, một số bình còn được nhận một lượng *Selenomonas ruminantium* hoặc *Megasphaera elsdenii*. Các vi khuẩn này là loại sử dụng lactat chính trong dạ cỏ và, ngoài ra, được tin rằng chúng có khả năng khử nitrat và/hoặc nitrit. *M. elsdenii* được thử nghiệm cả trong hỗn hợp với axit lactic, lý do cơ bản là axit lactic là cơ chất cho vi khuẩn và có tác dụng tích cực về tính cạnh tranh trong giới vi mô ở dạ cỏ. Như được thể hiện trên Fig.4, việc bổ sung NO_3 và MgSO_4 làm ức chế đáng kể sự sản sinh khí. Tác dụng này được thấy rõ hơn theo thời gian; tỷ lệ ức chế gần 25% lượng khí tích tụ sinh ra đo được ở thời điểm 12 giờ.

Khi so sánh với chế phẩm bổ sung nitrat, nguyên liệu cấy *S. ruminantium* có tác dụng tích cực đối với việc sinh khí trong 4 giờ đầu tiên. Tác dụng này có ý nghĩa về mặt thống kê ở các liều lượng từ 100 đến 1000 μl /40ml. Sự sản sinh khí ban đầu cũng được kích thích bởi *M. elsdenii*, nhưng chỉ ở liều lượng 1000 μl cao nhất. Khi axit lactic được tạo ra, việc sản sinh khí được ức chế, mà có thể là do tác dụng ức chế trực tiếp lên cơ chế chuyển hóa của vi sinh vật trong dạ cỏ. Tác dụng kích thích của *S. ruminantium* không được phát hiện tại thời điểm sau đó. Tuy nhiên, lượng *M. elsdenii* cao nhất tiếp tục làm tăng lượng khí tích tụ sinh ra, tác dụng tương đối tích cực còn rõ rệt hơn nữa vào thời điểm sau đó. Việc bổ sung axit lactic tiếp tục ức chế sự sản sinh khí phụ thuộc vào tổng thời gian ủ. Tuy nhiên, trong hỗn hợp với lactat, lượng *M. elsdenii* cao loại bỏ sự ức chế trao đổi chất và, trong thực tế, chuyển thành sự kích thích quá trình sản sinh khí. Mặc dù thực tế là *M. elsdenii* kích thích quá trình sản sinh khí ở liều lượng cao nhất, nhưng có thể không hoàn toàn khắc phục được tác dụng bất lợi của nitrat.

Tác dụng của các phương án xử lý lên sự sinh metan

Các tác giả sáng chế đã xác định được lượng CH_4 tạo thành ngoài lượng khí tổng sinh ra. Trong nghiên cứu lên men này, tỷ lệ metan trong tổng khí tạo thành là tương đối thấp, thấp hơn 10% (Fig.5B). Lượng sinh metan phụ thuộc vào khẩu phần ăn và tình trạng sinh lý của bò được dùng làm vật cho dịch dạ cỏ. Trong trường hợp này, động vật thử nghiệm là bò sữa có khẩu phần ăn giàu năng lượng. Nitrat trong khẩu phần ăn đã ức chế sự sinh metan tuyệt đối gần 80% (Fig.5A).

Tác dụng của các xử lý lên việc khử nitrat

Lượng nitrat cố định được thêm vào tất cả các bình mô phỏng, chỉ khác là chúng được dán nhãn “không thay đổi”, dưới dạng sản phẩm ‘Calcinit’ (sao cho nồng độ cuối cùng của nitrat 14mM). Trong nghiên cứu lên men, tổng khí metan tạo thành là từ 7 đến 8ml trong trường hợp vắng mặt nitrat và nó được giảm xuống còn 1,5ml khi nitrat được cung cấp.

Nồng độ nitrat và sản phẩm của quá trình khử nitrat, nitrit và amoni, được phân tích sau thời gian 2, 4 và 12 giờ sau khi cấy. Trong khi cung cấp nitrat nồng độ 14mM tại thời điểm 0 giờ, thì chỉ phát hiện thấy nitrat nồng độ khoảng 10mM trong phần dịch lọc trong toàn bộ bình sau 2 giờ. Ngoài ra, nitrat đo được trong dung dịch có nồng độ tương tự hoặc cao hơn một chút trong 2 giờ sau đó. Điều này gợi ý rằng nitrat được hấp thụ nhanh bởi chất nền rắn hoặc được hấp thụ bởi hệ vi sinh vật tại chỗ. Trạng thái cân bằng trong các phần sẽ được duy trì cho đến khi việc tiêu thụ nitrat bởi vi khuẩn đạt tốc độ tốt. Trong nghiên cứu này, bước lấy mẫu cuối cùng được chỉ ra sự sụt giảm hàm lượng nitrat trong khoảng thời gian từ 4 đến 12 giờ (Fig.6). Tác dụng của *M. elsdenii* với liều lượng cao đã gợi ý rằng việc khử nitrat được làm chậm đáng kể bởi liều lượng cao của vi khuẩn này.

Phân tích nitrit tại thời điểm 2 và 4 giờ phù hợp với dữ liệu nitrat. Tại thời điểm 2 giờ, nồng độ nitrit thấp hơn 0,05mM ở tất cả các nhóm xử lý đã gợi ý rằng tốc độ khử nitrat là thấp (Fig.7A). Tại thời điểm 4 giờ, hàm lượng nitrit bắt đầu tăng nhưng vẫn thấp hơn 0,2mM. Lưu ý là trong khi *S. ruminantium* có vẻ làm tăng nitrit theo cách phụ thuộc liều lượng, thì *M. elsdenii* lại làm giảm nitrit theo cách phụ thuộc liều lượng (Fig.7B). Sau 12 giờ, tác dụng của *M. elsdenii* rõ rệt hơn vì khi vắng mặt nó, nồng độ nitrit đã tăng lên tới 8mM và giảm theo cách phụ thuộc liều lượng khi vi khuẩn này được thêm vào. Với *M. elsdenii* tinh khiết, liều lượng 1000 μ l thay đổi là cần thiết để loại bỏ hoàn toàn nitrit. Tuy nhiên, khi kết hợp với lactat, liều lượng 100 μ l đã làm giảm nồng độ nitrit đến giới hạn phát hiện (Fig.7C). Tác dụng làm tăng nitrit của *S. ruminantium* không được phát hiện sau 12 giờ đã gợi ý rằng vai trò trao đổi chất của nó trong giới vi mô của dạ cỏ là không đáng kể.

Amoni là sản phẩm khử cuối cùng của nitrat/nitrit. Tuy nhiên, nó không phải là sản phẩm được mong đợi để tích tụ đáng kể trong hệ vi sinh vật do nó là dạng nitơ được đồng hóa dễ dàng bởi vi khuẩn khi không có sẵn nguồn nitơ hữu cơ. Vai trò nhất thời này của amoni khiến cho nó không thể làm chính xác các tính toán cân bằng hệ số tỷ lệ. Do đó, hiển nhiên là khi nitrat với nồng độ 14mM được thêm vào hệ lên men thì nồng độ amoni còn lại sau 12 giờ được tăng lên từ 10 đến 18mM. Khi *M. elsdenii* cũng được thêm vào môi trường lên men thì nồng độ amoni đạt tới khoảng từ 23 đến 31mM phụ thuộc vào lượng cơ chất lactat bổ sung được cung cấp (Fig.8C). Các dữ liệu này rõ ràng thể hiện rằng sự biến đổi nồng độ nitrat dẫn đến sự tạo thành hoặc tích tụ amoni tăng lên. Dữ liệu này cũng gợi ý rằng *M. elsdenii* làm tăng cường quá trình trao đổi chất này. Nồng độ amoni còn lại đạt đỉnh ở liều lượng *M. elsdenii* là 100 μ l, và ở liều lượng 1000 μ l cho thấy sự suy thoái rõ rệt.

Kết luận

Các dữ liệu này đã xác nhận một lần nữa rằng nitrat trong khẩu phần ăn làm giảm sự sinh metan. Nó cũng cho thấy rằng nitrat bị khử thành nitrit và sau đó thành amoni. Quy trình này có vẻ có mối liên kết trực tiếp với sự sinh metan vì các điều kiện ngăn đáng kể sự khử nitrat cũng làm giảm mức độ ức chế sự sinh metan.

Sự thay đổi lượng *M. elsdenii* không làm thúc đẩy việc khử nitrat mà trên thực tế có vẻ là ức chế quá trình này. Trái lại, vi khuẩn này làm giảm nồng độ nitrit còn lại theo cách phụ thuộc liều lượng và, đồng thời, tăng nồng độ của sản phẩm khử của nó, amoni. Các dữ liệu này gợi ý rằng chủng vi khuẩn này có chức năng nitrat reductaza, nhưng một số vi khuẩn khác lại xúc tác việc khử nitrat thành nitrit, chủng *M. elsdenii* dễ dàng khử nitrit tiếp thành amoni. Đặc điểm này khiến cho *M. elsdenii* là thành phần ngăn ngừa lý tưởng sự ngộ độc nitrit gây ra bởi quá trình sản sinh và tích tụ nitrit nhanh chóng của vi khuẩn khử nitrat.

Theo kiến thức đã biết, *M. elsdenii* không phải là thành phần sử dụng lactat chính trong bò sữa. Tuy nhiên, ở bò thịt được cho ăn khẩu phần ăn giàu ngũ cốc, các điều kiện cho *M. elsdenii* là thích hợp. Nguyên nhân là thành phần hay sử dụng lactat này có tính cạnh tranh cao chỉ khi hàm lượng axit lactic trong dạ cỏ cao. Đặc điểm này của vi khuẩn là nguyên nhân tại sao các tác giả sáng chế đã thử nghiệm cả tác dụng

của axit lactic và hỗn hợp *M. elsdenii* – axit lactic. *M. elsdenii* có tác dụng đối với các thông số khác nhau theo cách tương tự khi có mặt axit lactic hoặc không, nhưng khi axit lactic được cung cấp thì tác dụng này sẽ mạnh hơn. Điều này gợi ý rằng tính cạnh tranh của *M. elsdenii* được cải thiện bởi lactat.

Tại sao *M. elsdenii* với liều lượng cao lại ức chế sự khử nitrat? Điều này chỉ có thể được nghiên cứu trong sáng chế này và câu trả lời cuối cùng chỉ có thể thu được từ thử nghiệm được thiết kế cụ thể. Một lời giải thích hợp lý có thể là do *M. elsdenii* cạnh tranh một số chất dinh dưỡng thiết yếu hoặc các đồng yếu tố với vi khuẩn khử nitrat chính. Do sự sinh trưởng của *M. elsdenii* không phụ thuộc vào việc khử nitrit và không cạnh tranh với chất khử nitrat. Một cách giải thích hợp lý khác là sự ức chế sản phẩm cuối. *M. elsdenii* với lượng cao làm tăng nồng độ amoni, mà có thể đóng vai trò làm chất ức chế ngược với quá trình khử nitrat.

Tài liệu tham khảo

- Alaboudi, A. R. and G. A. Jones. 1985. Effect of Acclimation to High Nitrate Intakes on Some Rumen Fermentation Parameters in Sheep. Canadian Journal of Animal Science 65:841-849.
- Asanuma, N., M. Iwamoto, and T. Hino. 1999. Effect of the Addition of Fumarate on Methane Production by Ruminal Microorganisms In Vitro. J. Dairy Sci. 82(4):780-787.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. Oâ€™Mara, and T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture 48(2):21-27.
- Bruning-Fann, C. S. and J. B. Kaneene. 1993. The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. Vet Hum Toxicol 35(3):237-253.
- Evelyn, K. A. and H. T. Malloy. 1938. MICRODETERMINATION OF OXYHEMOGLOBIN, METHEMOGLOBIN, AND SULFHEMOGLOBIN IN A SINGLE SAMPLE OF BLOOD journal of biological chemistry 126:655-663.

- Guo, W. S., D. M. Schafer, X. X. Guo, L. P. Ren, and Q. X. Meng. 2009. Use of nitrate-nitrogen as a sole dietary nitrogen source to inhibit ruminal methanogenesis and to improve microbial nitrogen synthesis *in vitro*. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 22(4):542-549.
- Iwamoto, M., Asanuma N., and Hino, T. 1999 Effects of nitrate combined with fumarate on methanogenesis, fermentation, and cellulose digestion by mixed ruminal microbes *in vitro*. *Animal Science Journal* 70(6):471-478.
- Iwamoto, M., Asanuma N., and Hino, T. 2001. Effects of pH and electron donors on nitrate and nitrite reduction in ruminal microbionics. *Animal Science Journal* 72(2):117-125.
- Joblin, K. N. 1999. Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian Journal of Agricultural Research* 50(8):1307-1314.
- Johnson, K. A. and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci* 73(8):2483-2492.
- Le Van, T. D., J. A. Robinson, J. Ralph, R. C. Greening, W. J. Smolenski, J. A. Z. Leedle, and D. M. Schaefer. 1998. Assessment of Reductive Acetogenesis with Indigenous Ruminal Bacterium Populations and *Acetitomaculum ruminis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9):3429-3436.
- Lewis, D. 1951. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep; the reduction of nitrate in the rumen of the sheep. *Biochem. J.* 48(2):175-170.
- Marais, J. P., J. J. Therion, R. I. Mackie, A. Kistner, and C. Dennison. 1988. Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. *British Journal of Nutrition* 59(02):301-313.
- Molano, G., T. W. Knight, and H. Clark. 2008. Fumaric acid supplements have no effect on methane emissions per unit of feed intake in wether lambs. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48(2):165-168.
- Sar, C., B. Mwenya, B. Santoso, K. Takaura, R. Morikawa, N. Isogai, Y. Asakura, Y. Toride, and J. Takahashi. 2005. Effect of *Escherichia coli* wild type or its derivative

with high nitrite reductase activity on in vitro ruminal methanogenesis and nitrate/nitrite reduction. *J. Anim Sci.* 83(3):644-652.

Sar, C., B. Santoso, B. Mwenya, Y. Gamo, T. Kobayashi, R. Morikawa, K. Kimura, H. Mizukoshi, and J. Takahashi. 2004. Manipulation of rumen methanogenesis by the combination of nitrate with [beta]1-4 galacto-oligosaccharides or nisin in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 115(1-2):129-142.

Steinfeld, H., P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, and C. De Haan. 2006. *Livestock's Long Shadow*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Takahashi, J., M. Ikeda, S. Matsuoka, and H. Fujita. 1998. Prophylactic effect of L-cysteine to acute and subclinical nitrate toxicity in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 74(3):273-280.

Takahashi, J., and Young, B.A. 1991. Prophylactic effect of L-cysteine on nitrate-induced alterations in respiratory exchange and metabolic rate in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 35:105-113.

Takahashi, J., N. Johchi, and H. Fujita. 1989. Inhibitory effects of sulphur compounds, copper and tungsten on nitrate reduction by mixed rumen micro-organisms. *British Journal of Nutrition* 61(03):741-748.

Ungerfeld, E. M., R. A. Kohn, R. J. Wallace, and C. J. Newbold. 2007. A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *J. Anim Sci.* 85(10):2556-2563.

Verstegen, M. W. A., W. Van der Hel, H. A. Brandsma, A. M. Henken, and A. M. Bransen. 1987. *The Wageningen respiration unit for animal production research: A description of the equipment and its possibilities*. Energy Metabolism in Farm Animals: Effects of Housing, Stress and Disease. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp không phải phương pháp điều trị bệnh để làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại, phương pháp này bao gồm bước cho động vật nhai lại dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat, trong đó tổng lượng nitrat và sulphat hỗn hợp lớn hơn 10 g/kg và nhỏ hơn 750 g/kg.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này làm tăng tính hiệu quả của chất dinh dưỡng ở động vật nhai lại.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này tăng cường sự tăng trưởng và/hoặc năng suất ở động vật nhai lại.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hỗn hợp được dùng với lượng để cung cấp tổng liều lượng nitrat và sulphat lớn hơn 0,05 g/kg cân nặng mỗi ngày.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó hợp chất nitrat được dùng với lượng để cung cấp liều lượng nitrat nằm trong khoảng từ 0,025 đến 8g/kg cân nặng mỗi ngày và trong đó hợp chất sulphat được dùng với lượng để cung cấp liều lượng sulphat nằm trong khoảng từ 0,025 đến 1,8 g/kg cân nặng mỗi ngày.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho động vật nhai lại dùng vi sinh vật có lợi (probiotic) khử nitrit với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 1×10^{14} cfu/kg/ngày.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho động vật nhai lại dùng lượng hữu hiệu của hợp chất lactat.
8. Thức ăn dạng hỗn hợp được tạo viên dành cho động vật nhai lại chứa hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat, hỗn hợp này cung cấp tổng lượng nitrat và sulphat lớn hơn 10 g/kg, trong đó lượng sulphat lớn hơn 7,5 g/kg tính theo trọng lượng khô, trong đó thức ăn dạng hỗn hợp được tạo viên dành cho động vật nhai lại làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại, và trong đó tổng lượng nitrat và sulphat hỗn hợp nhỏ hơn 750 g/kg.

9. Thức ăn dạng hỗn hợp dành cho động vật theo điểm 8, trong đó lượng nitrat lớn hơn 7,5 g/kg tính theo trọng lượng khô.
10. Thức ăn dạng hỗn hợp dành cho động vật theo điểm 8, trong đó thức ăn này còn chứa vi sinh vật có lợi khử nitrit.
11. Thức ăn dạng hỗn hợp dành cho động vật theo điểm 10, trong đó vi sinh vật có lợi khử nitrit được chọn từ *Megasphaera elsdenii* và *Propionibacterium acidipropionici*.
12. Chế phẩm bổ sung thức ăn dành cho động vật nhai lại chứa hỗn hợp của hợp chất nitrat và hợp chất sulphat, trong đó lượng sulphat trong chế phẩm bổ sung thức ăn dành cho động vật, tính theo trọng lượng khô, lớn hơn 25 g/kg và không vượt quá 250 g/kg; trong đó tổng lượng nitrat và sulphat hỗn hợp nhỏ hơn 250 g/kg; trong đó chế phẩm bổ sung này làm giảm sự sinh metan trong dạ dày-ruột ở động vật nhai lại; và trong đó chế phẩm bổ sung này ở dạng được chọn từ bột, chất rắn dạng bánh, và chất rắn được tạo hạt.

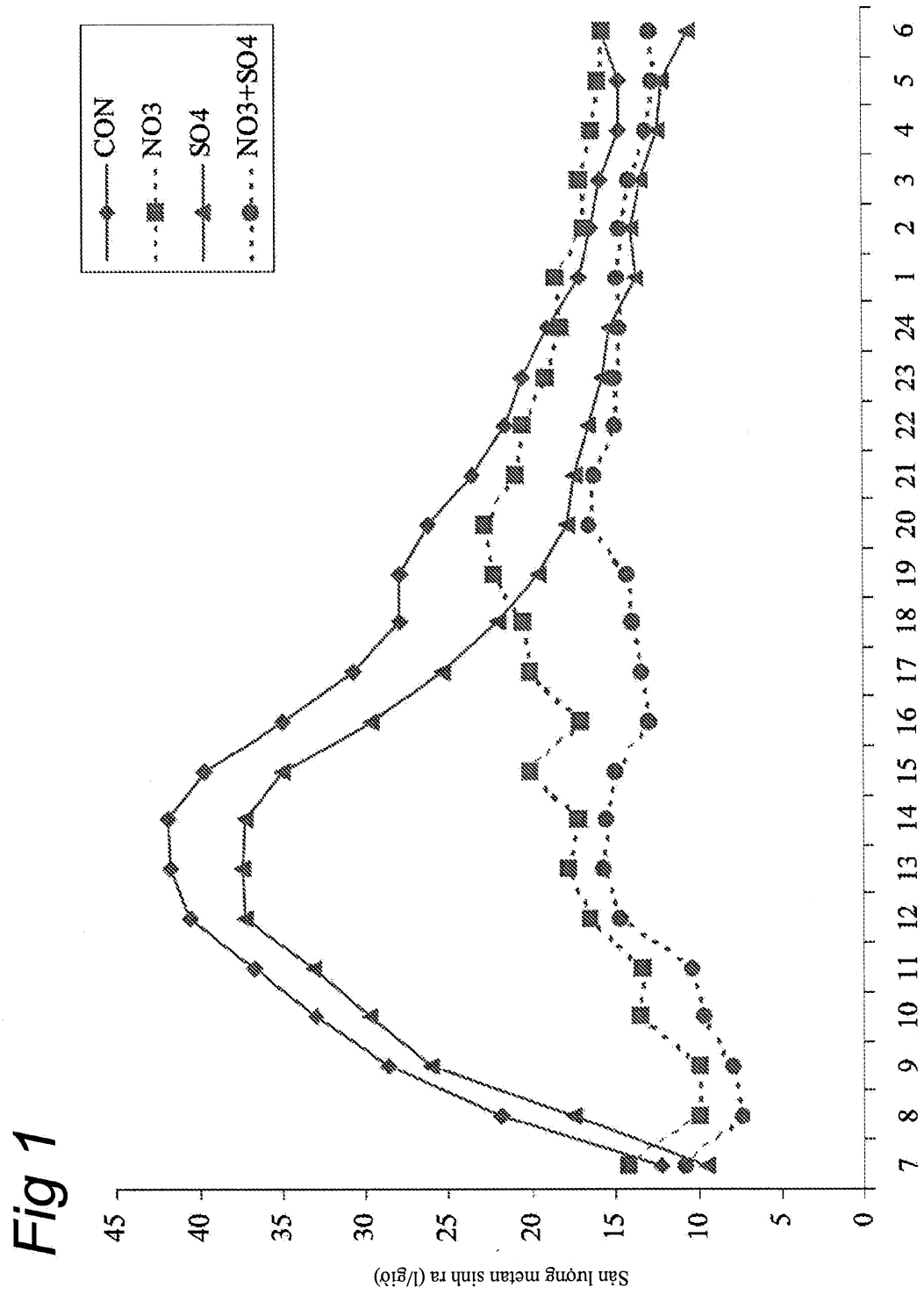


Fig 2

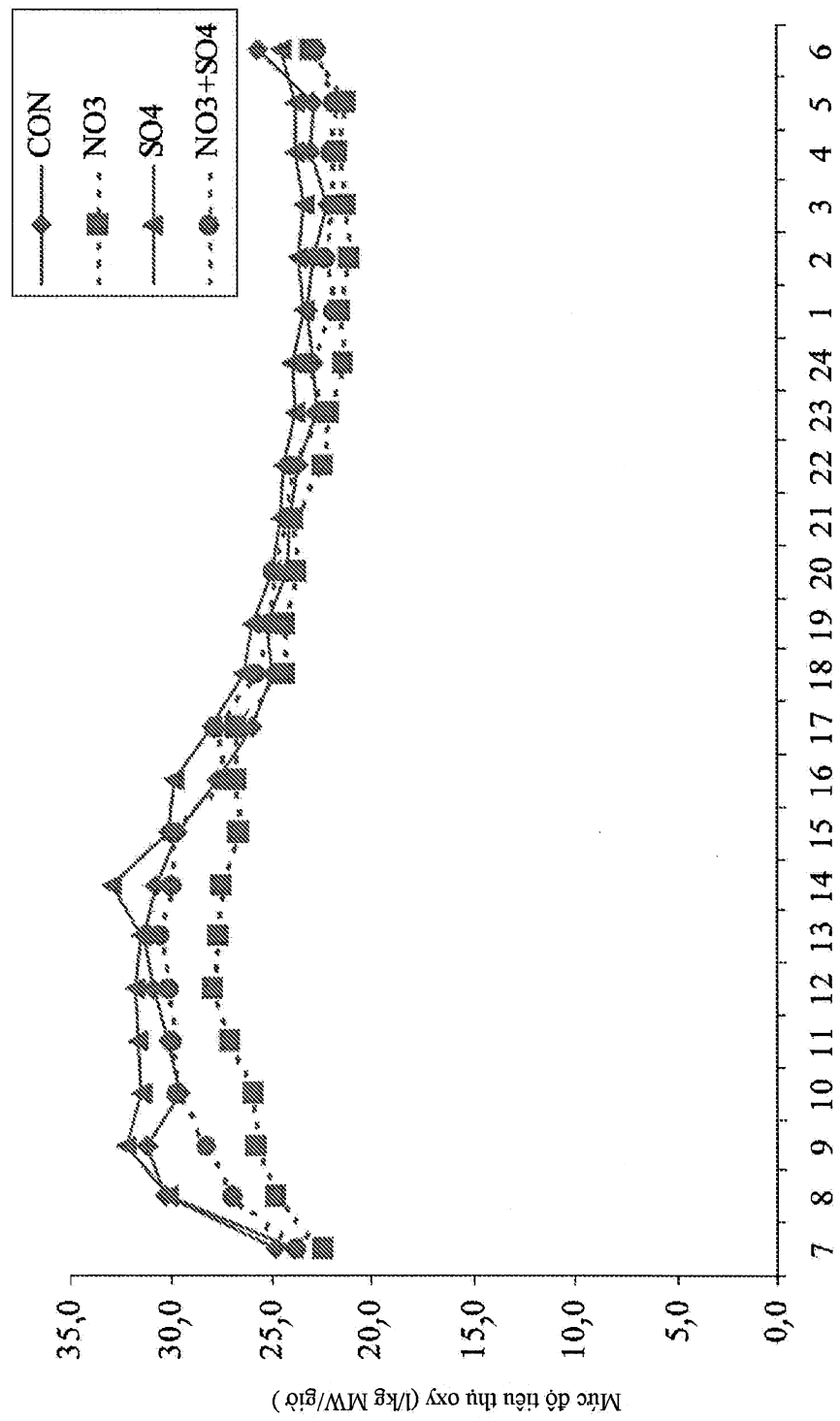


Fig 3

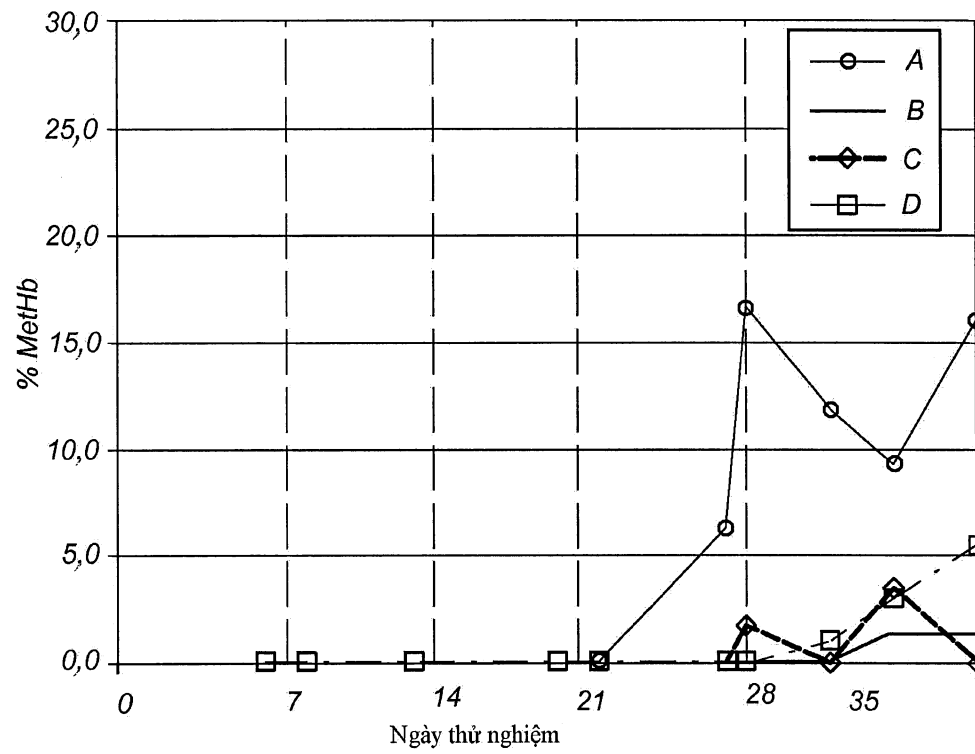


Fig 4a

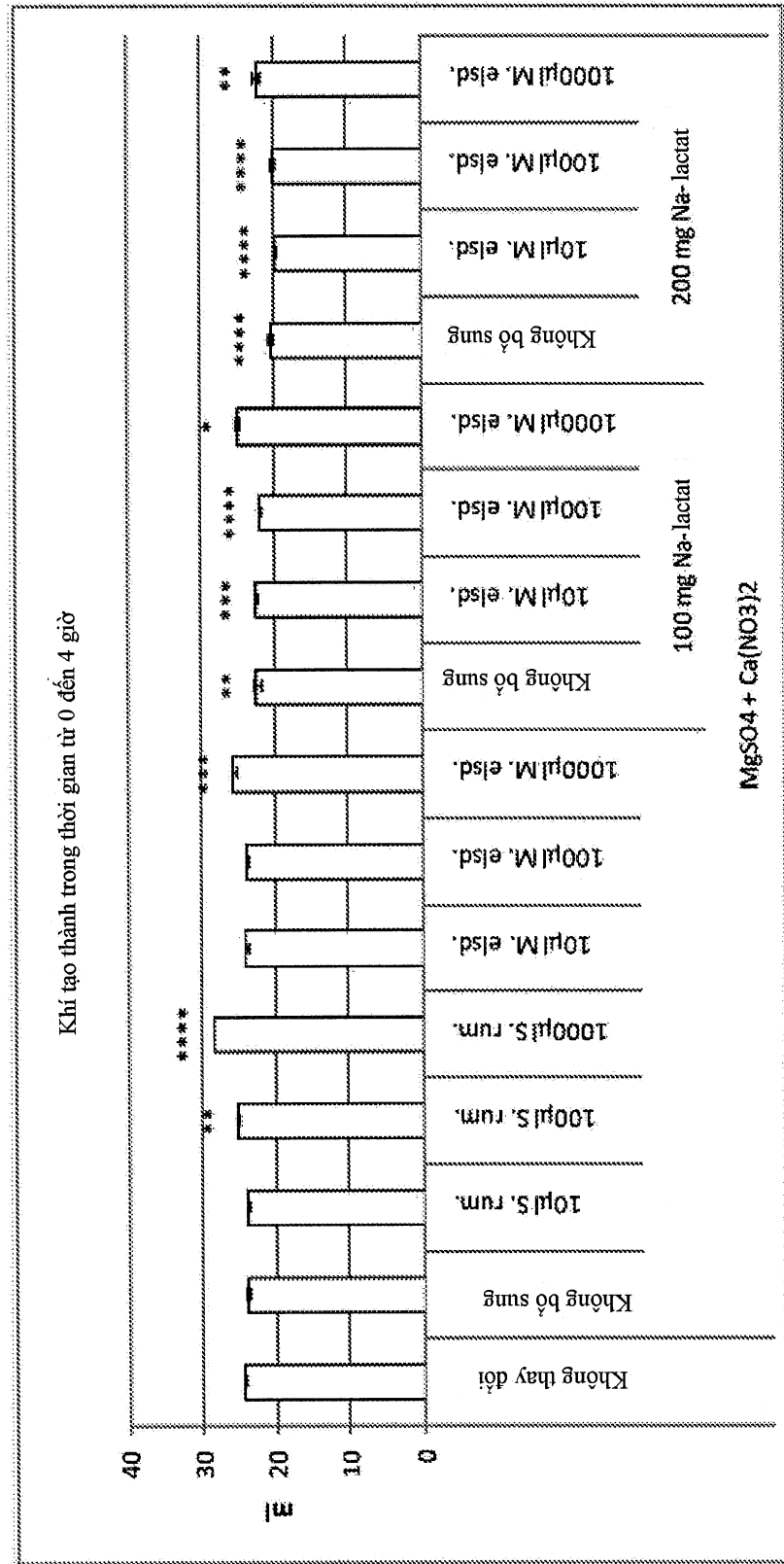
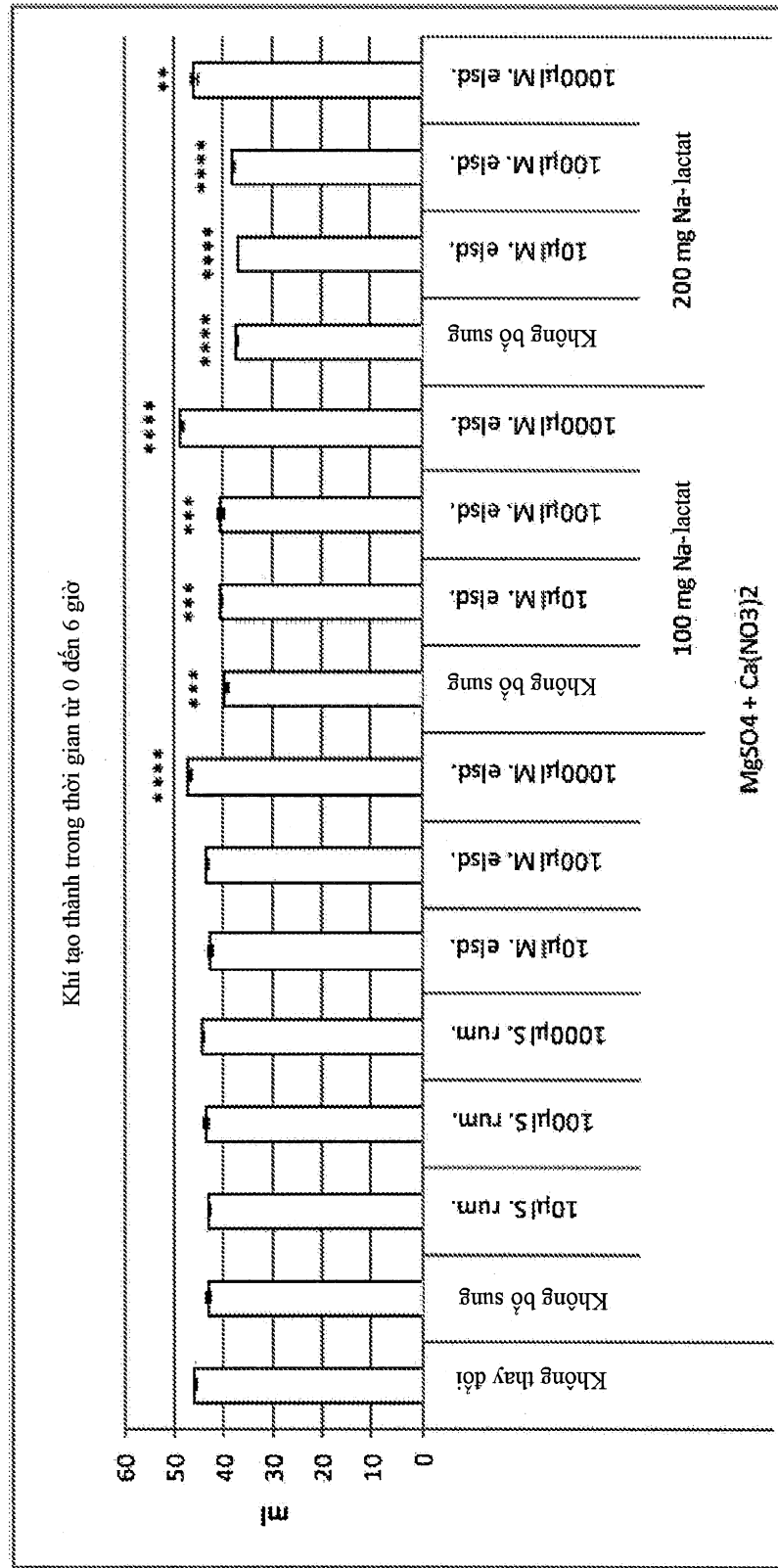


Fig 4b



Khí tạo thành trong thời gian từ 0 đến 12 giờ

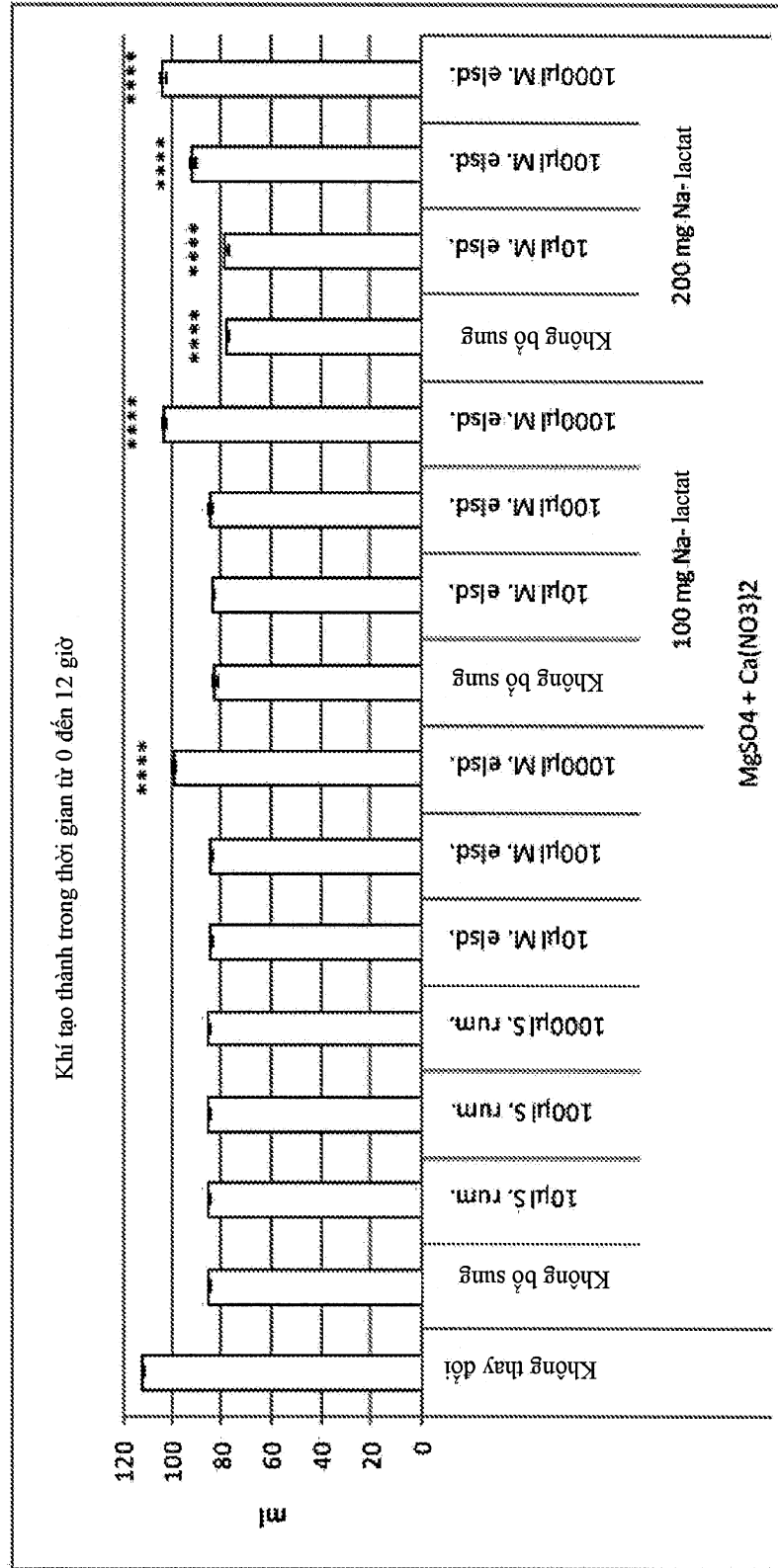


Fig 5a

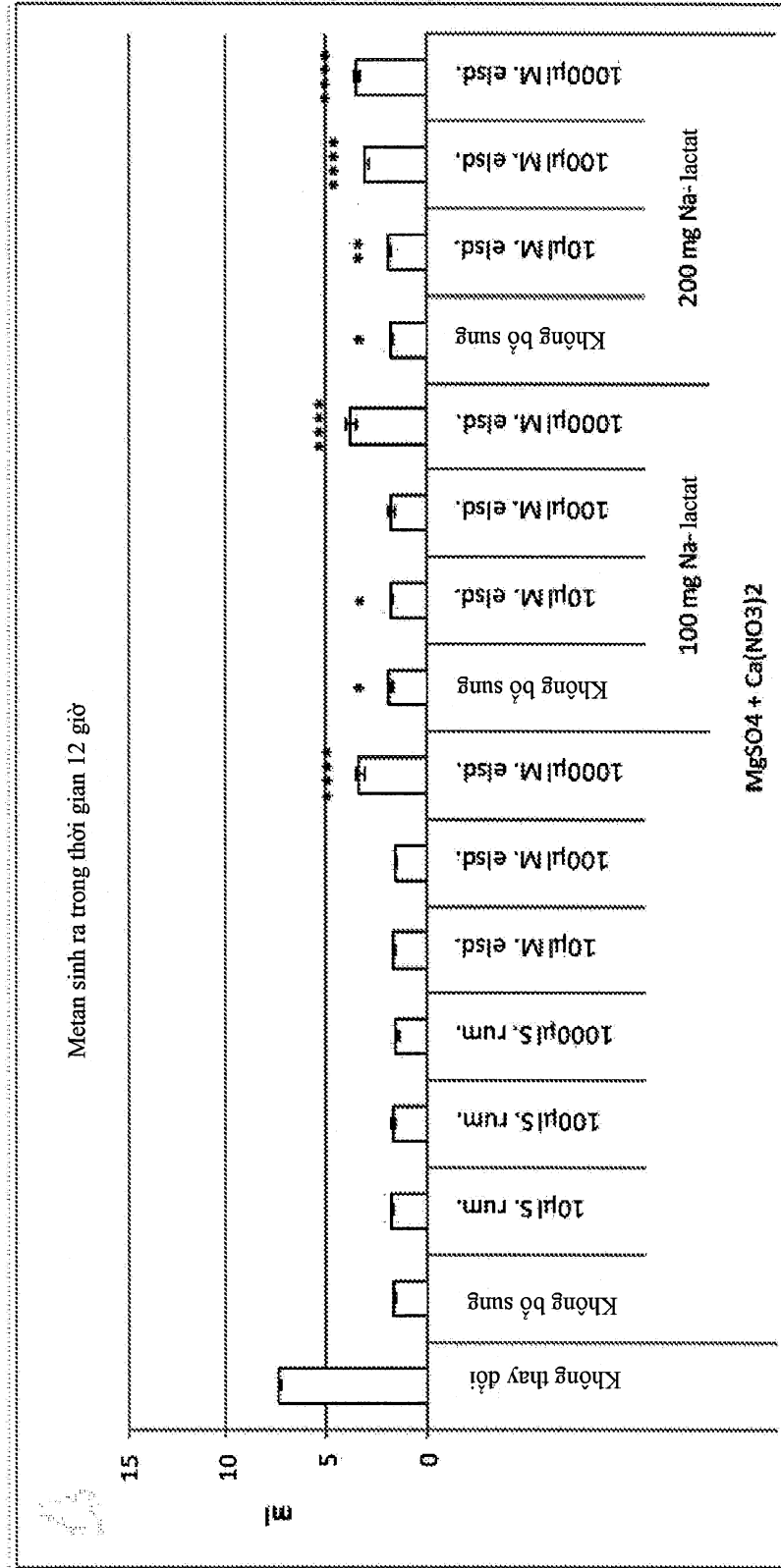


Fig 5b

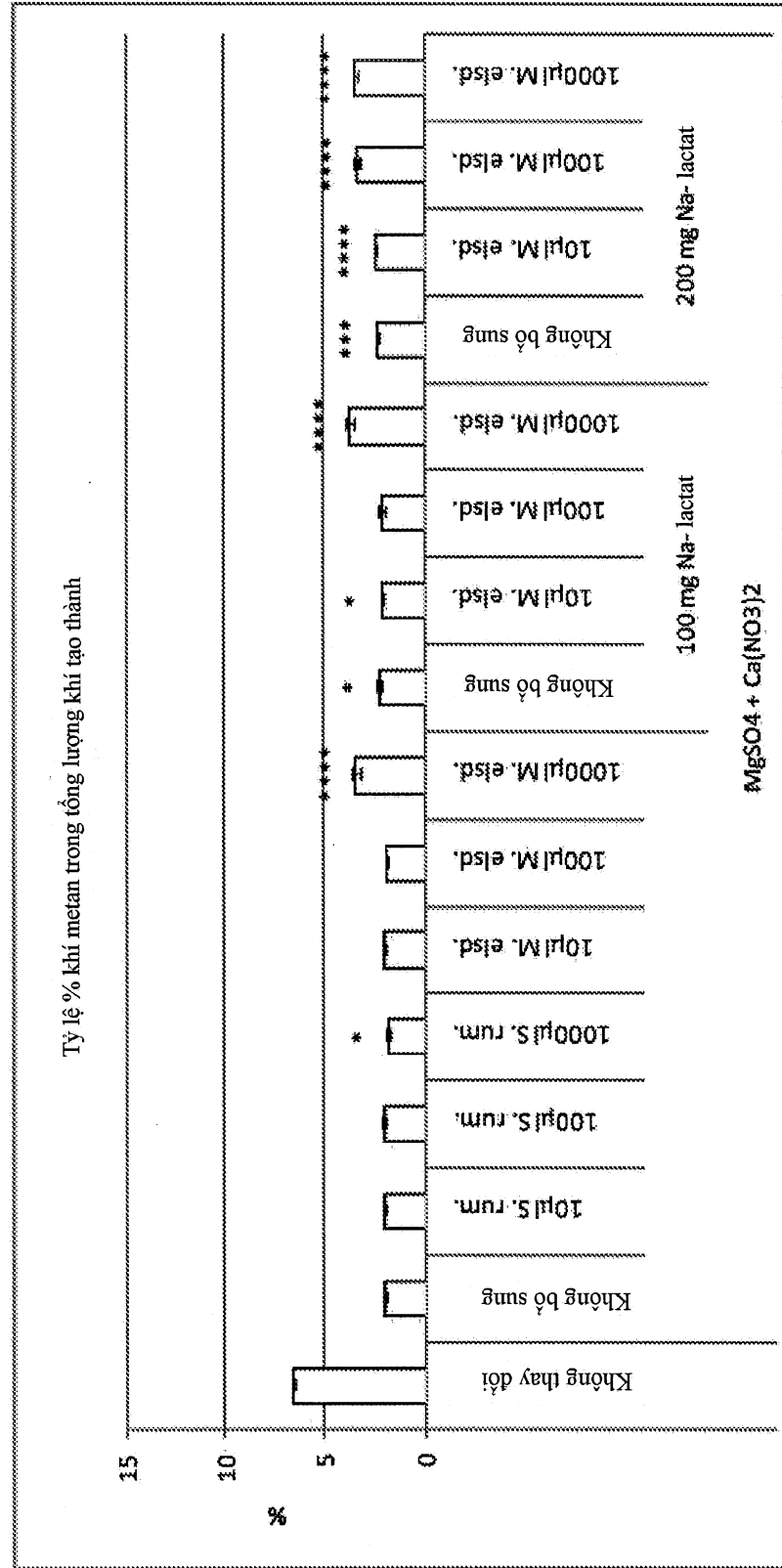


Fig 6a

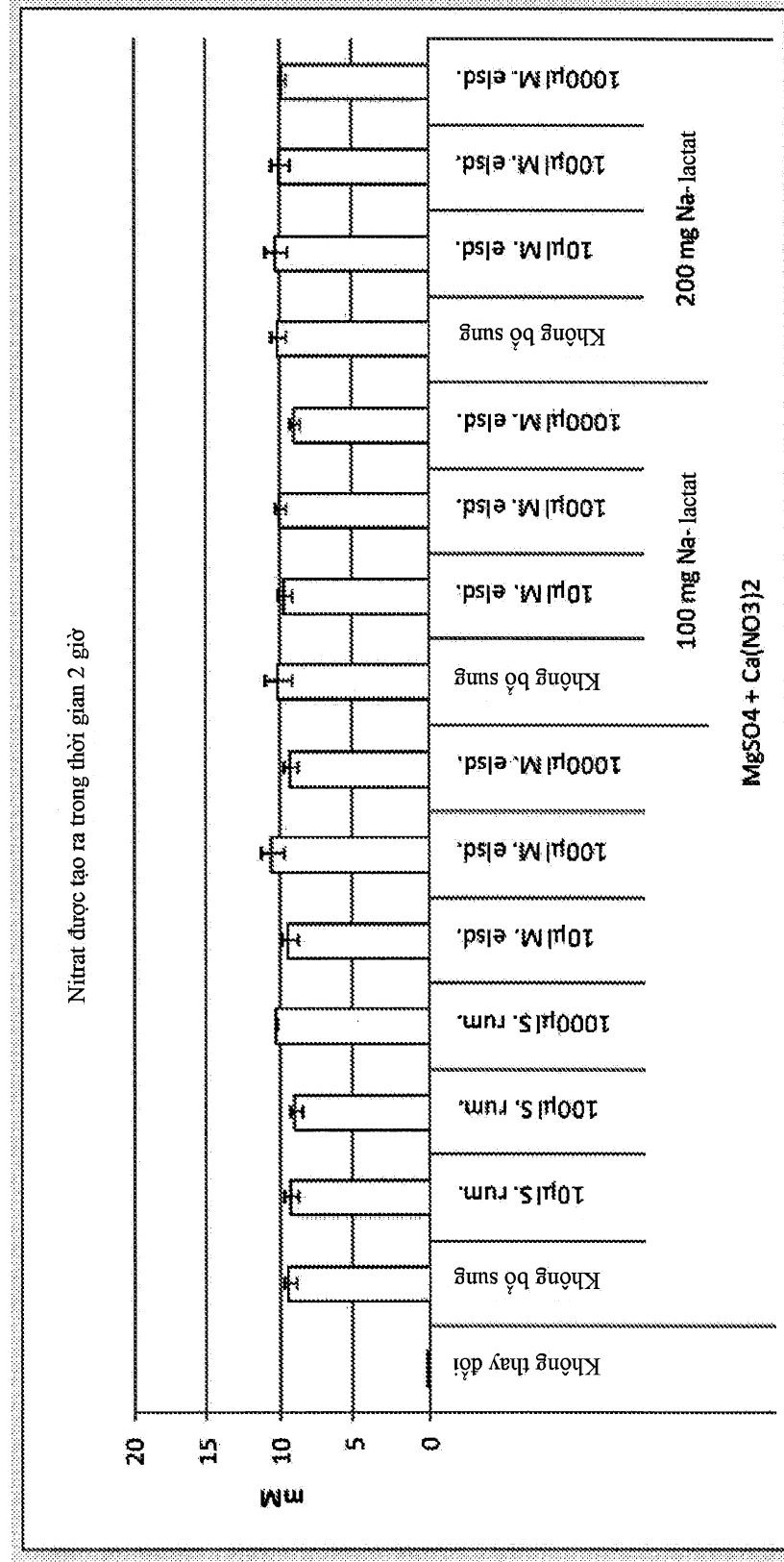


Fig 6b

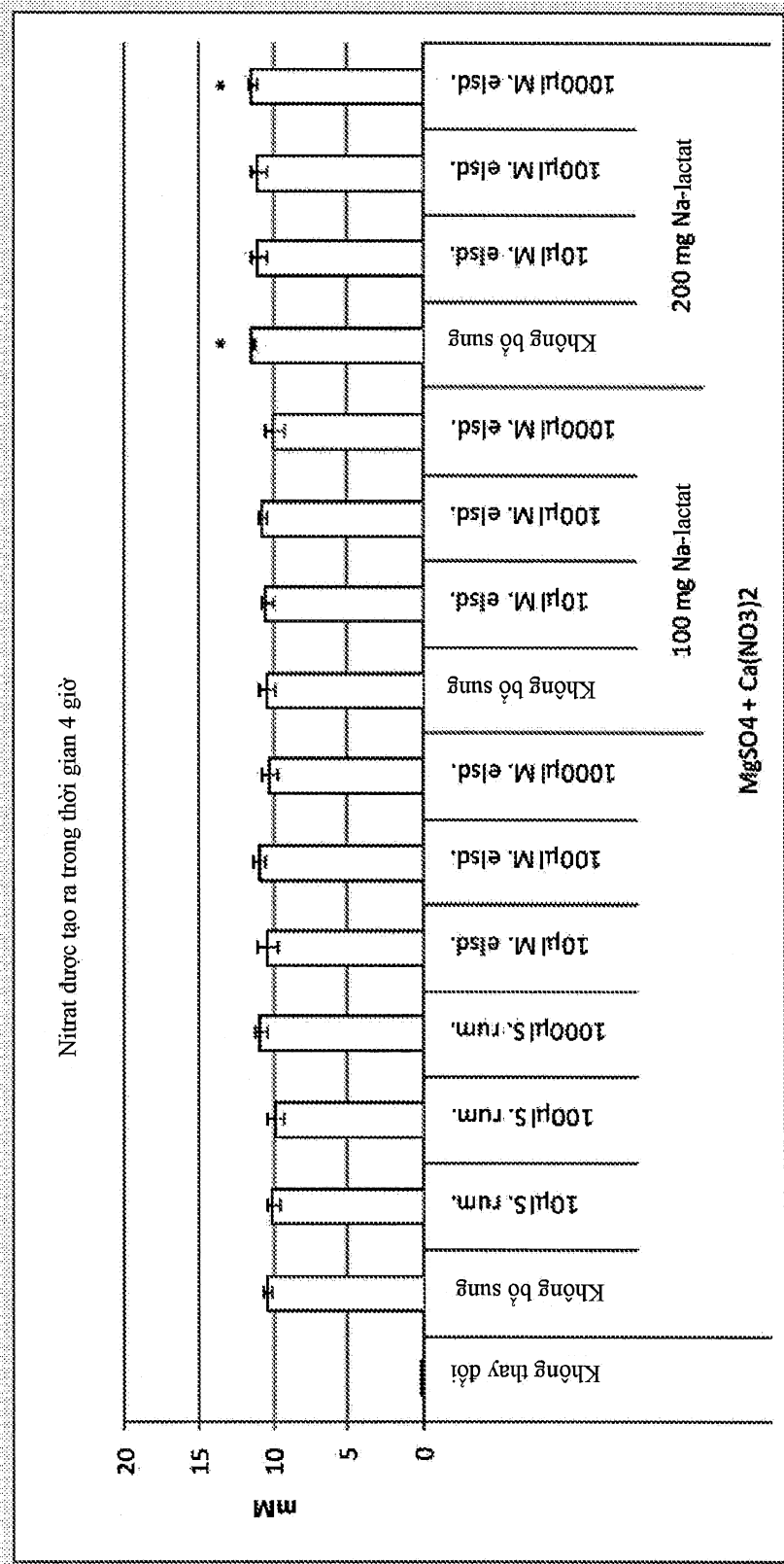


Fig 6c

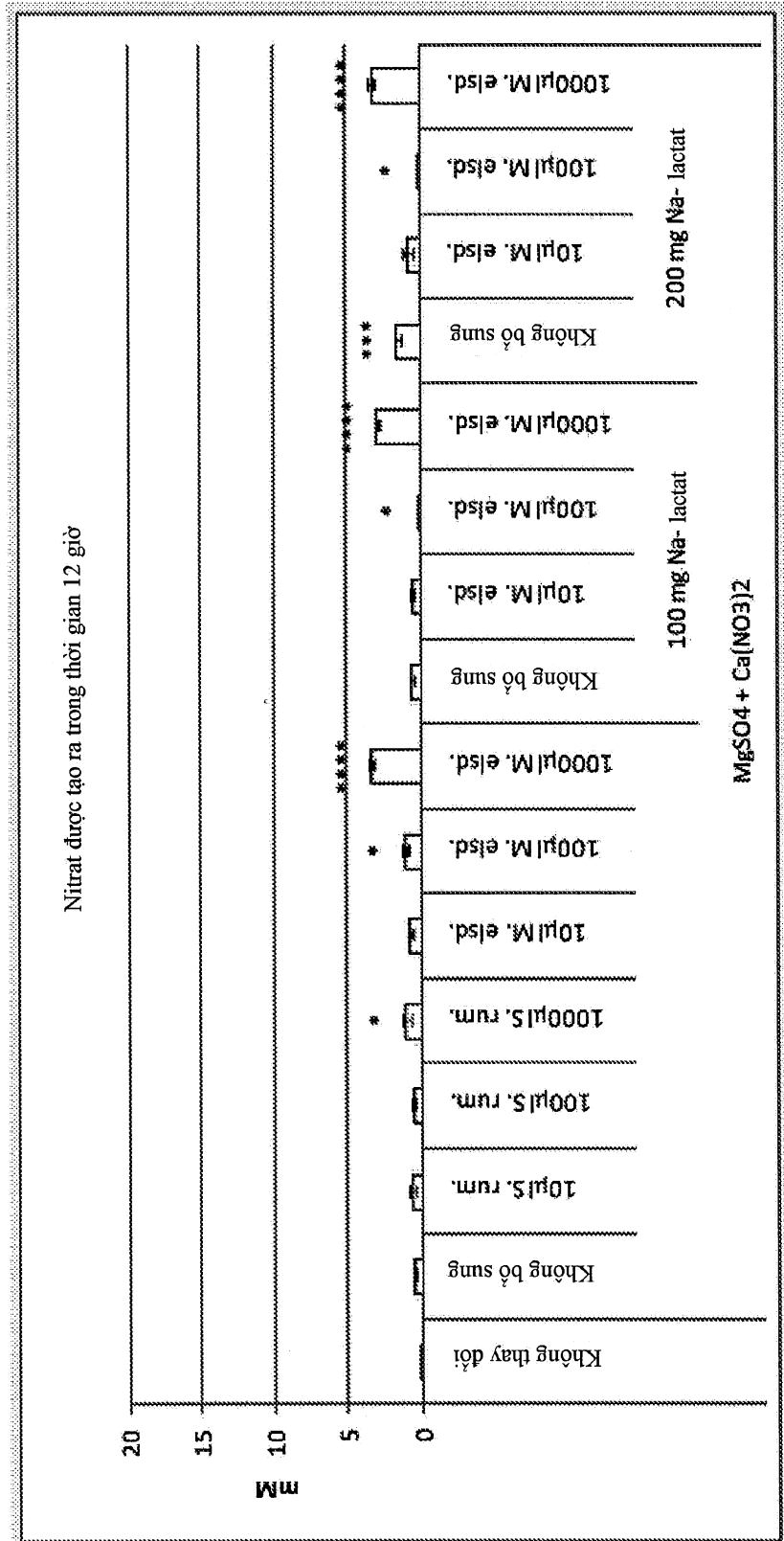


Fig 7a

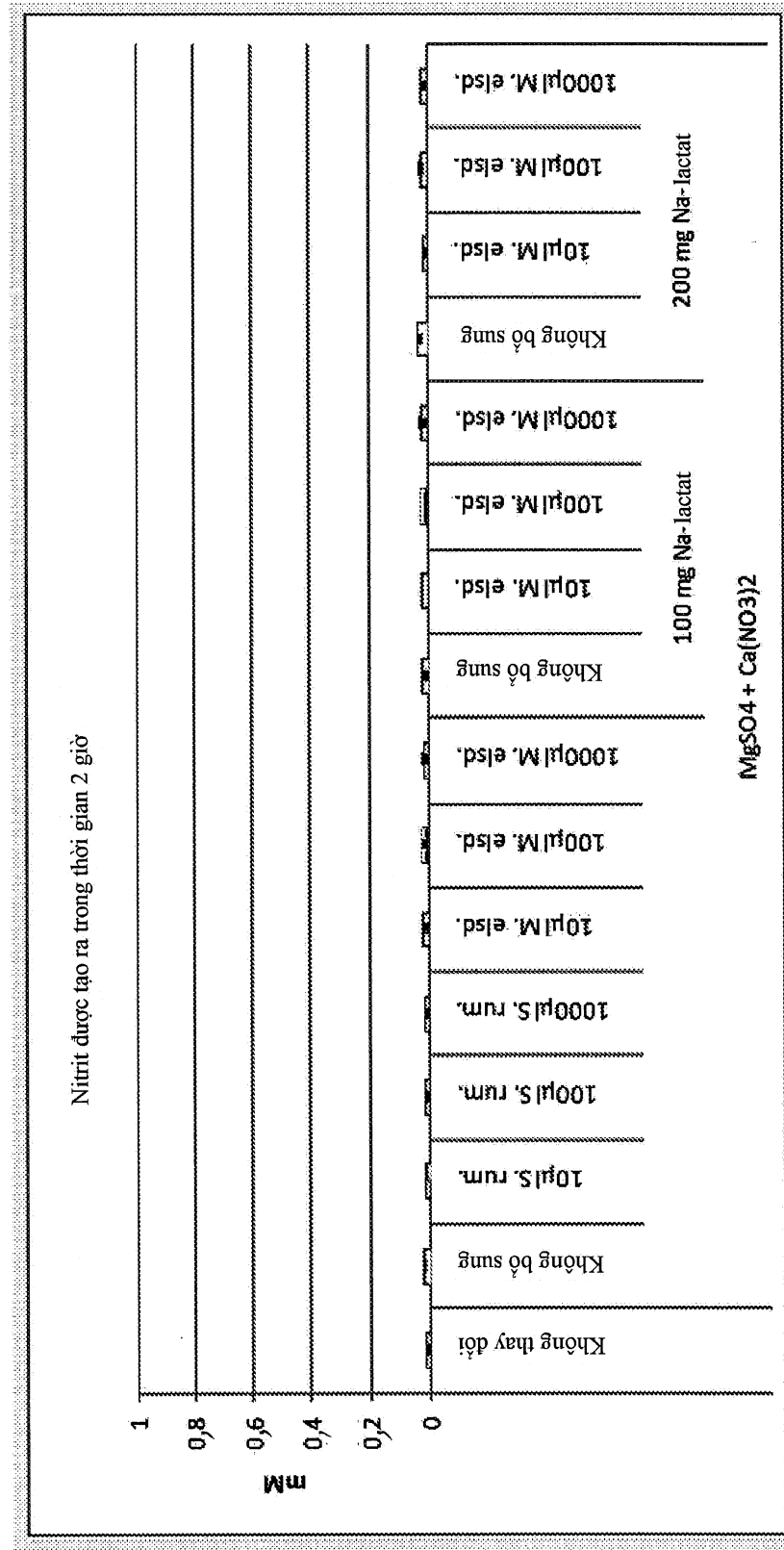


Fig 7b

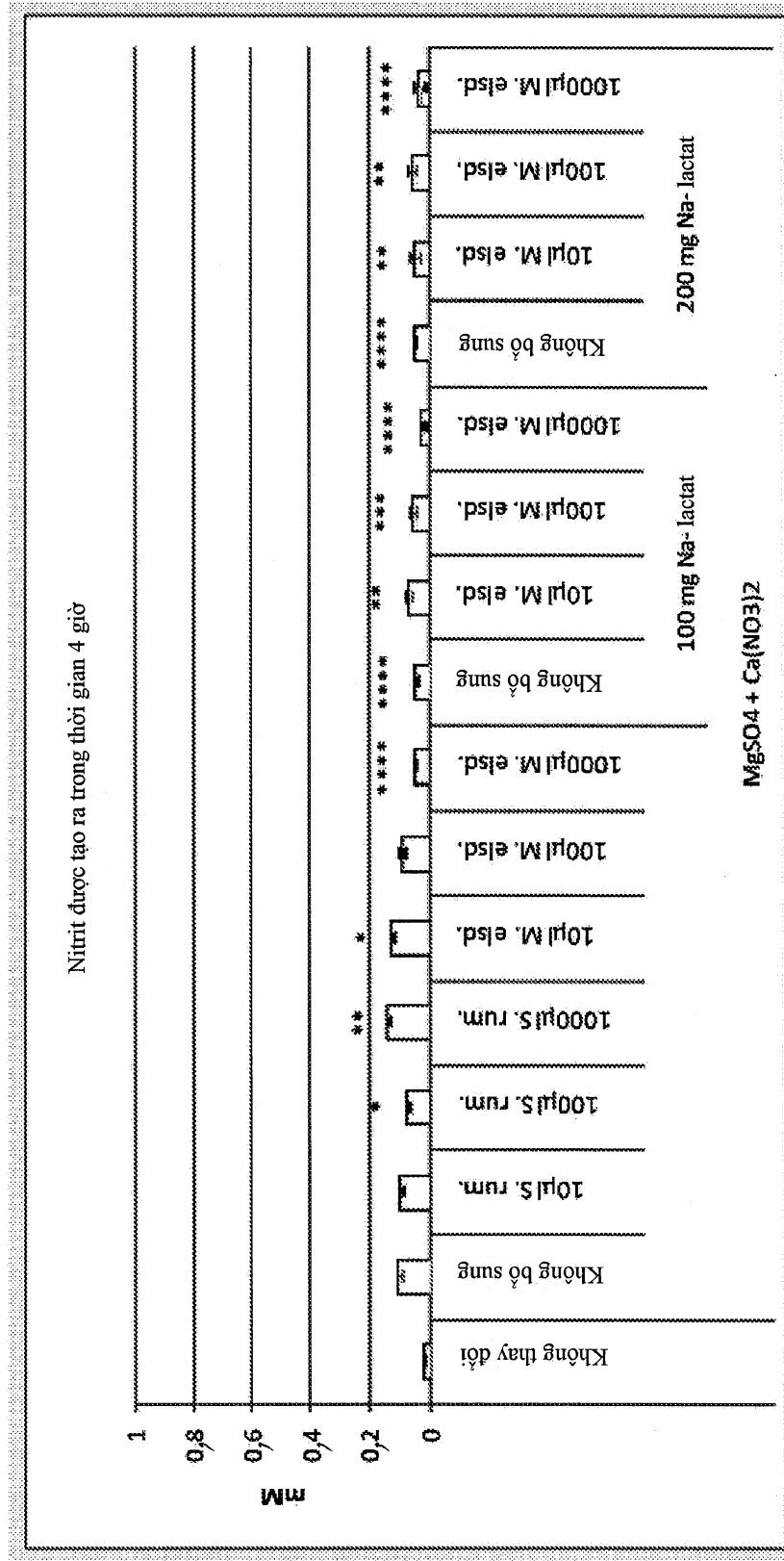


Fig 7c

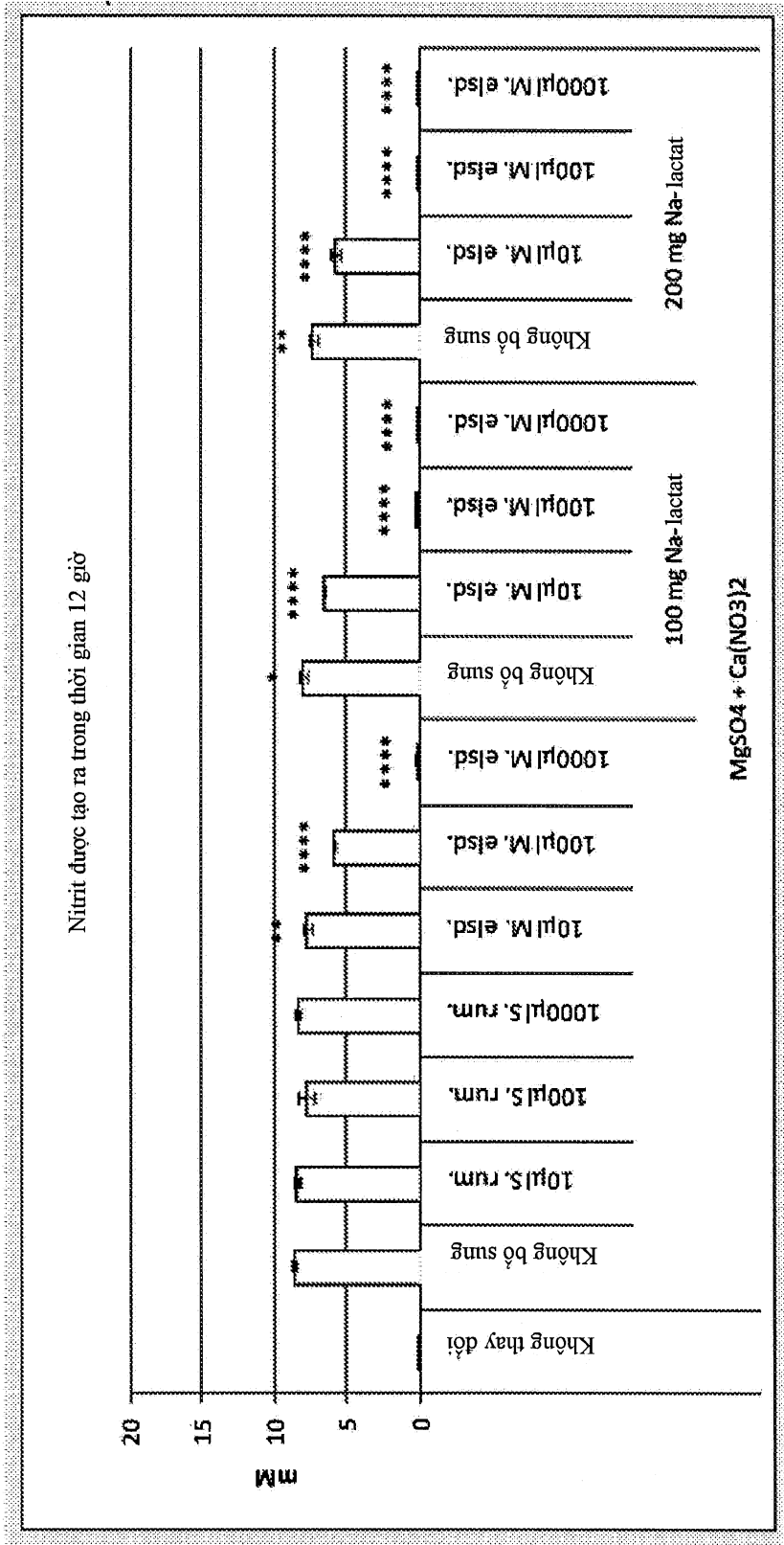


Fig 8a

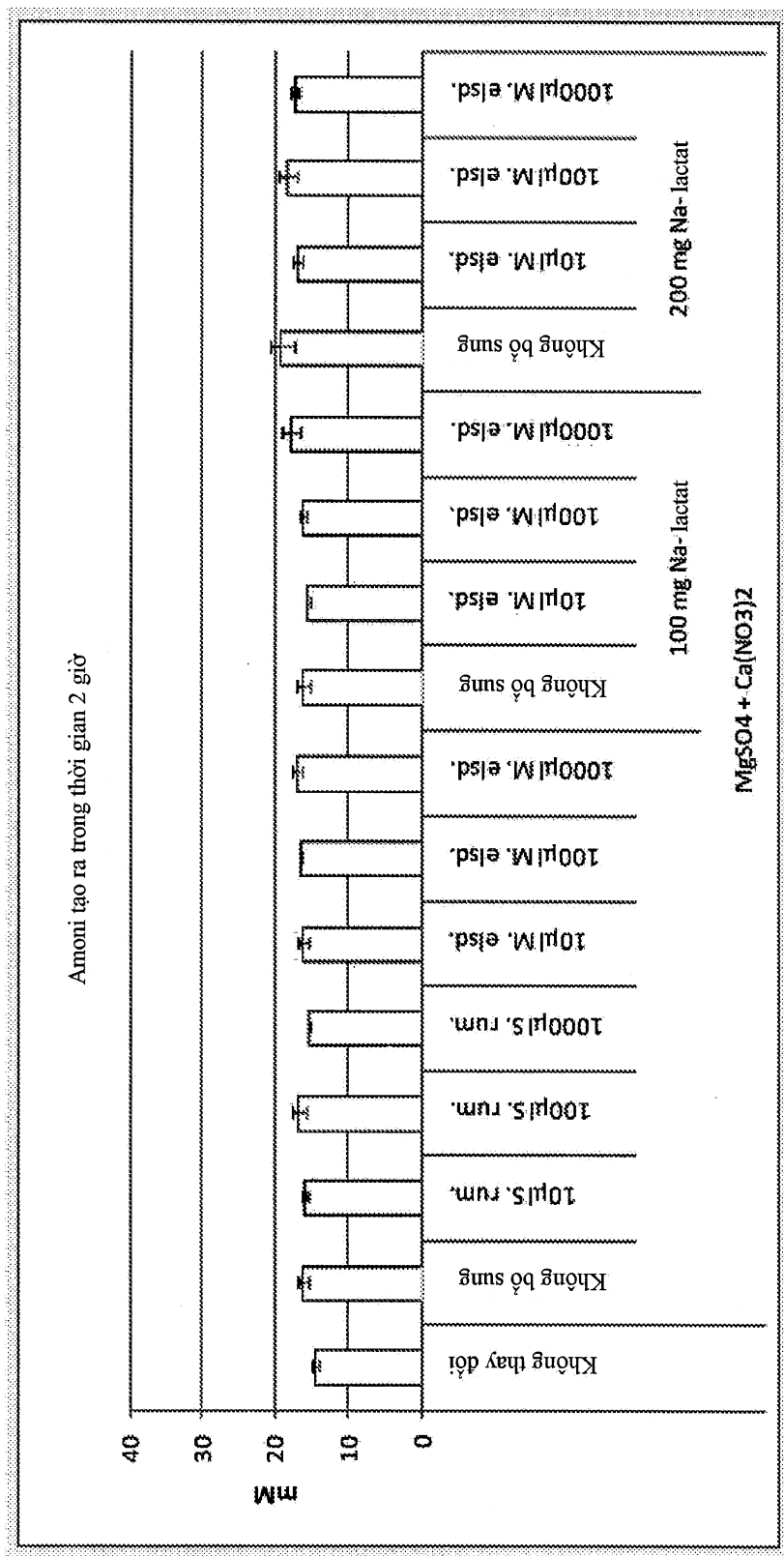


Fig 8b

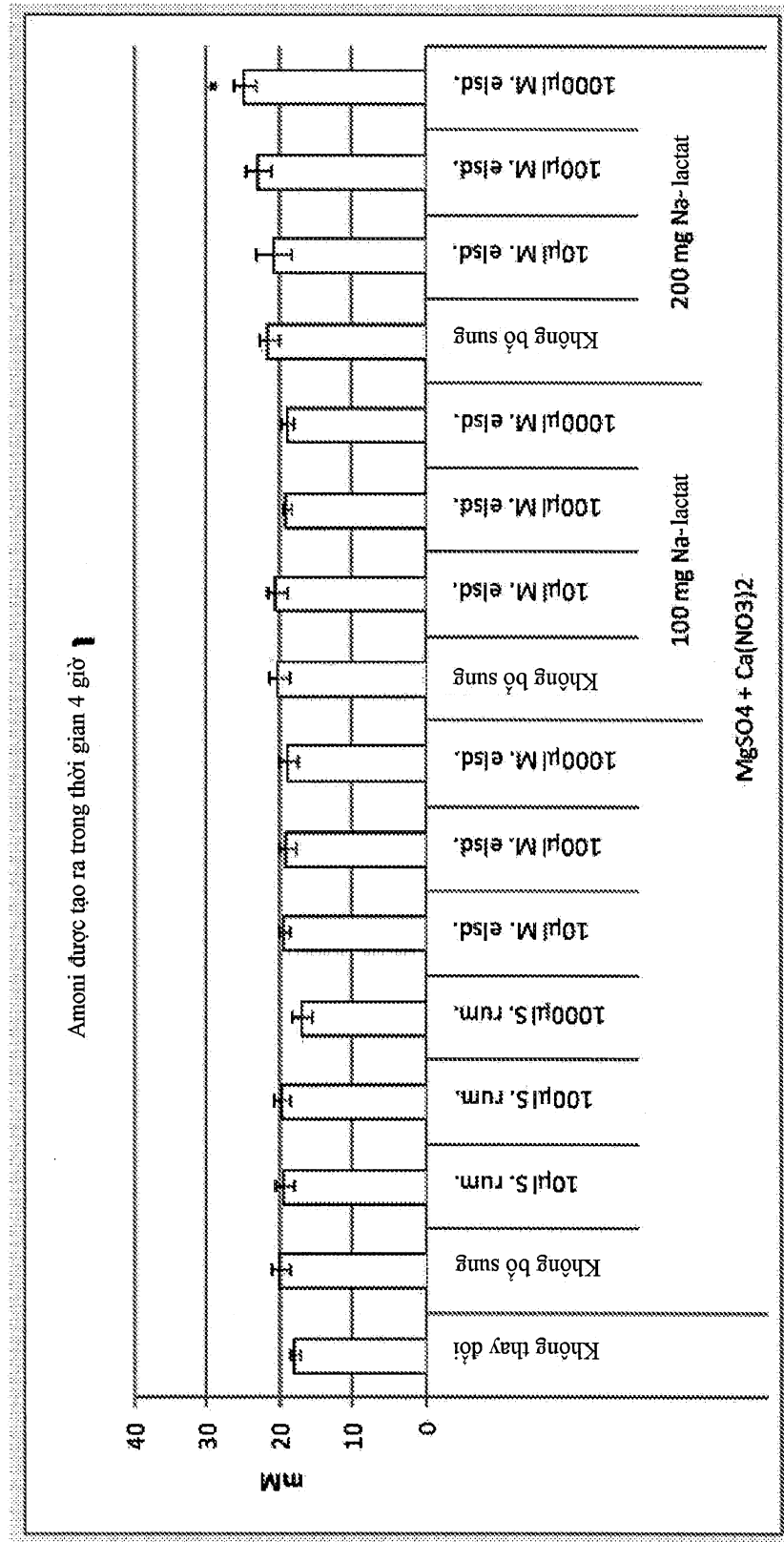


Fig 8c

